

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE UND STRUKTUR
DES FETTSÄURESYNTHESE-KOMPLEXES DER HEFE**

von
Gerhard Dietlein
aus
Neuebersbach

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546220_0073

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE UND STRUKTUR DES FETTSÄURESYNTHESE-KOMPLEXES DER HEFE

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades



vorgelegt

von

Gerhard Dietlein

aus

Neuebersbach



Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 11. 1976

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. E. Schweizer

Erstberichterstatte: Prof. Dr. E. Schweizer

Zweitberichterstatte: Prof. Dr. H. Kersten

Die vorliegende Dissertation wurde in den Jahren
1973 - 1975 im Institut für Biochemie der Universität
Würzburg und von 1975 - 1976 im Institut für Mikrobiologie
und Biochemie der Universität Erlangen - Nürnberg unter
der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Schweizer angefertigt.

Für die Durchführung der Aminosäure-Analysen danke
ich Herrn Dr. E. Schiltz, Physiologisch-Chemisches Institut
der Universität Würzburg.

Die Arbeit wurde selbständig ausgeführt. Andere als
die angegebenen Hilfsmittel und Quellen wurden nicht verwendet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Inhaltsverzeichnis	1
Verzeichnis der Figuren	4
Verzeichnis der Tabellen	6
I. <u>EINLEITUNG</u>	7
II. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	12
1. Chemikalien	12
2. Apparate	12
3. Hefestämme	14
4. Medien	14
5. Herstellung der diploiden Stämme <u>fas 1-155/</u> <u>fas 2-180</u> und <u>fas 1-270/fas 2-180</u>	16
6. Herstellung von <u>fas 1/fas 2</u> Doppelmutanten	17
7. Hefeanzucht	17
(a) Anzucht homogener, genetisch definierter Kulturen	17
(b) Markierung von Hefezellen mit ¹⁴ C-Pantothensäure	18
(c) Markierung von Hefezellen mit ¹⁴ C-Aminosäuregemisch	19
8. Aufschluß der Hefezellen	19
9. Fettsäuresynthetase-Isolation	19
10. Proteinbestimmungen	20
11. Enzymtests	22
12. Immunpräzipitation von Fettsäuresynthetase in Hefezellen-Rohextrakten	22
13. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	23
14. Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in SDS-Gelen	24
15. Carboxyl-Endgruppenbestimmung der Fett- säuresynthetase-Untereinheiten A und B durch Carboxypeptidasen	24

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Inhaltsverzeichnis	1
Verzeichnis der Figuren	4
Verzeichnis der Tabellen	6
 I. <u>EINLEITUNG</u>	 7
 II. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	 12
1. Chemikalien	12
2. Apparate	12
3. Hefestämme	14
4. Medien	14
5. Herstellung der diploiden Stämme <u>fas 1-155/</u> <u>fas 2-180</u> und <u>fas 1-270/fas 2-180</u>	16
6. Herstellung von <u>fas 1/fas 2</u> Doppelmutanten	17
7. Hefeanzucht	17
(a) Anzucht homogener, genetisch definierter Kulturen	17
(b) Markierung von Hefezellen mit ¹⁴ C-Pantothensäure	18
(c) Markierung von Hefezellen mit ¹⁴ C-Aminosäuregemisch	19
8. Aufschluß der Hefezellen	19
9. Fettsäuresynthetase-Isolation	19
10. Proteinbestimmungen	20
11. Enzymtests	22
12. Immunpräzipitation von Fettsäuresynthetase in Hefezellen-Rohextrakten	22
13. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	23
14. Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in SDS-Gelen	24
15. Carboxyl-Endgruppenbestimmung der Fett- säuresynthetase-Untereinheiten A und B durch Carboxypeptidasen	24

	Seite
16. Isoelektrische Focussierung von gereinigter Fettsäuresynthetase	25
(a) Focussierung im Polyacrylamidgel	25
(b) Präparative Focussierung in einer Mikrosäule	
III. <u>ERGEBNISSE</u>	29
A. UNTERSUCHUNGEN ZUR KONTROLLE DES AUSDRUCKS DER FETTSÄURESYNTHETASE-GENORTE	29
1. Nachweis der <u>fas 1</u> und <u>fas 2</u> Genprodukte durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Hefezellen-Rohextrakten	29
(a) Vorversuche mit Wildtyp-Zellen	29
(b) SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Rohextrakten verschiedener <u>fas</u> -Mutanten	30
(i) Untersuchung von komplementierenden <u>fas</u> -Missens-Mutanten	30
(ii) Untersuchung des Rohextraktes nicht-komplementierender <u>fas</u> -Missens-Mutanten	30
(iii) Untersuchung des Rohextraktes von <u>fas</u> -Nonsens-Mutanten	38
2. Einbau von ¹⁴ C-Pantothensäure in den Fettsäuresynthetase-Komplex von <u>fas 1</u> -Nonsens-Mutanten	42
3. Untersuchung der Synthese von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten in nicht-komplementierenden <u>fas</u> -Mutanten durch Markierung mit radioaktiven Aminosäuren	48
(a) Untersuchung der Synthese von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten in <u>fas</u> -ts-Mutanten bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur	48
(b) Untersuchung der Synthese von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten in nicht-komplementierenden, nicht-conditionalen <u>fas</u> -Mutanten	49

	Seite
(c) Untersuchung des Einbaus radioaktiver Aminosäuren in die getrennten Fettsäuresynthetase-Untereinheiten	53
4. Immunologische Charakterisierung komplementierender und nicht-komplementierender <u>fas</u> -Mutanten	53
(a) Immun-Doppeldiffusions-Analyse von Zell-extrakten komplementierender und nicht-komplementierender <u>fas</u> -Mutanten mit spezifischem Fettsäuresynthetase-Antiserum	55
(b) Immun-Doppeldiffusions-Analyse von Fettsäuresynthetase-CRM nach Denaturierung des Enzyms mit SDS	63
B. UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR DES FETTSÄURE-SYNTHETASE-KOMPLEXES	67
1. Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren in den Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B	67
2. Versuche zur Anreicherung des abnormalen Fettsäuresynthetase-CRM aus nicht-komplementierenden <u>fas</u> -Mutanten	70
3. Vergleichende Untersuchung gereinigter, SDS-denaturierter <u>fas</u> -Mutanten Enzyme	79
4. Versuche zur präparativen Trennung der beiden Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B	84
IV. <u>DISKUSSION</u>	90
V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	95
VI. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	98
Benutzte Abkürzungen	104
Lebenslauf	105
Anhang	106

Verzeichnis der Figuren

	Seite
Fig. 1 Hypothetisches Modell des Komplexes (a) und Gen-Enzym-Beziehungen (b) im Fettsäuresynthetase-System der Hefe	8
Fig. 2 Nachweis von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten im Heferohextrakt nach Chromatographie an Sepharose 4 B	31
Fig. 3 SDS-Gelelektrophorese TCA-behandelter Wildtyp-Extrakte	32
Fig. 4 Sephadex G-25-Gelfiltration von Hefezellen-Rohextrakten	33
Fig. 5 SDS-Gelelektrophorese von Hefezellen-Rohextrakten nach Gelfiltration über Sephadex G-25	39
Fig. 6 Immundiffusion mit Rohextrakten von ts-Mutanten nach Wachstum bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur	41
Fig. 7 Trennung von Fettsäuresynthetase-gebundener und freier ^{14}C -Pantothersäure durch Gelfiltration an Sephadex G-25	44
Fig. 8 Gelfiltration des Zellextraktes von ^{14}C -Pantothersäure-gewachsenen Wildtyp- (a) und <u>fas 1-267</u> - (b) Zellen an Sephadex G-25	45
Fig. 9 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Wildtyp (a) und <u>fas 1-267</u> (c) Rohextrakten nach Anzucht in ^{14}C -Pantothersäure-markiertem Medium	47
Fig. 10 Einbau ^{14}C -markierter Aminosäuren in Fettsäuresynthetase-Protein komplementierender und nicht-komplementierender temperatur-sensitiver <u>fas</u> -Mutanten	50
Fig. 11 Einbau ^{14}C -markierter Aminosäuren in Fettsäuresynthetase-Protein komplementierender und nicht-komplementierender <u>fas</u> -Mutanten	51
Fig. 12 Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in einzelne Fettsäuresynthetase-Untereinheiten unter den in Fig. 10 und 11 beschriebenen Bedingungen	54

Fig. 13 Immunologischer Vergleich CRM-positiver, nicht-komplementierender Missens-Mutanten	59
Fig. 14 Immunelektrophorese von Rohextrakten einer komplementierenden (a) und einer nicht-komplementierenden (b) Missens-Mutante	61
Fig. 15 Immundiffusions-Analyse von nativen (a) und SDS-denaturierten (b) Hefe-Rohextrakten mit spezifischem Fettsäuresynthetase-Antiserum	64
Fig. 16 Sedimentation nativer sowie von SDS-denaturierter, gereinigter Wildtyp-Fettsäuresynthetase im Saccharose-Dichtegradienten	65
Fig. 17 Präparative Trennung der Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B durch SDS-Flachgelelektrophorese	68
Fig. 18 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von gereinigten Fettsäuresynthetase-Präparationen aus Wildtyp-Zellen (a) und aus der nicht-komplementierenden Missens-Mutante <u>fas 1-155</u> (b)	72
Fig. 19 Immundiffusionsanalyse verschiedener Fraktionen der Anreicherung von <u>fas 1-155</u> -Fettsäuresynthetase	74
Fig. 20 Chromatographie von <u>fas 1-155</u> -CRM (b) sowie von Wildtyp-Fettsäuresynthetase (a) an DEAE-Cellulose, sowie immunologische Charakterisierung der dabei erhaltenen Fraktionen (c)	76
Fig. 21 Sedimentation der CRM-positiven Fraktionen aus Fig. 20 im Saccharose-Dichtegradienten	77
Fig. 22 SDS-Gelelektrophorese von Immunpräzipitaten aus dem Rohextrakt von Hefezellen	80
Fig. 23 SDS-Flachgelelektrophorese von gereinigten Fettsäuresynthetase-Präparationen aus verschiedenen <u>fas</u> -Mutanten	82
Fig. 24 Isoelektrische Focussierung gereinigter Fettsäuresynthetase-Präparationen im Polyacrylamidgel	85
Fig. 25 pH-Gradient im Polyacrylamidgel nach isoelektrischer Focussierung	86
Fig. 26 Präparative isoelektrische Focussierung gereinigter Fettsäuresynthetase im Saccharose-Gradienten in Gegenwart von 6 M Harnstoff	88

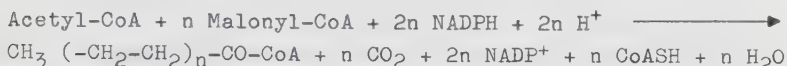
	Seite
Fig. 27 Präparative isoelektrische Focussierung nativer (a) und gereinigter, SDS-denaturierter (b) Fettsäuresynthetase im Saccharose-Gradienten	89
Fig. 28 Aminosäure-Chromatogramm eines Kontroll-Gels ohne Fettsäuresynthetase mit Carboxypeptidasen	107
Fig. 29 Aminosäure-Chromatogramm des Carboxypeptidase-Hydrolysates der Fettsäuresynthetase-Untereinheit A	108
Fig. 30 Aminosäure-Chromatogramm des Carboxypeptidase-Hydrolysates der Fettsäuresynthetase-Untereinheit B	109

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1 Zusammenstellung der <u>fas</u> -Mutanten, deren Rohextrakte durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese untersucht wurden	36
Tab. 2 Immunologische Untersuchung von Rohextrakten nicht-komplementierender <u>fas</u> -Mutanten	56
Tab. 3 Immundiffusionsanalyse von Rohextrakten nicht-komplementierender, temperatur-sensitiver Mutanten nach Anzucht bei permissiver bzw. nicht-permissiver Temperatur	57
Tab. 4 Nachweis von Fettsäuresynthetase-CRM in unterschiedlich verdünnten Hefe-Rohextrakten	62
Tab. 5 Quantitative Bestimmung der aus den Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B mit Carboxypeptidasen freigesetzten Aminosäuren	69
Tab. 6 β -Ketoacyl-Reduktase-Aktivität im Zellextrakt von nicht-komplementierenden, CRM-positiven <u>fas</u> -Mutanten	71
Tab. 7 Anreicherung von Fettsäuresynthetase-CRM aus der nicht-komplementierenden Mutante <u>fas 1-155</u>	75

I. E I N L E I T U N G

In der Hefe Saccharomyces cerevisiae wird die Biosynthese langkettiger, gesättigter Fettsäuren durch den Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase nach folgender Bruttogleichung katalysiert:

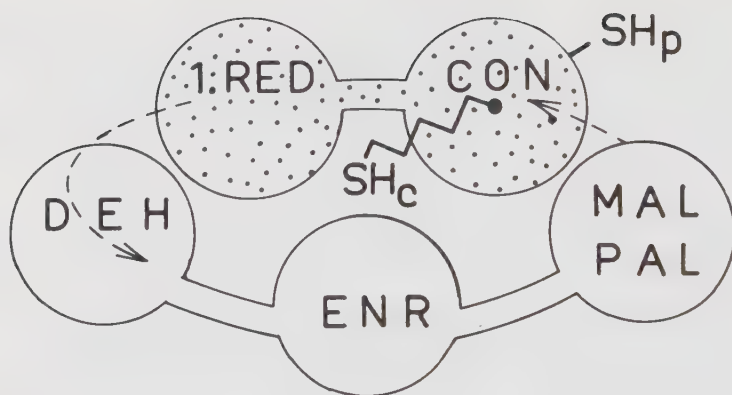


LYNEN konnte zeigen (1, 2), daß sich diese Gesamtreaktion aus einer zyklisch wiederholten Folge von sieben Einzelschritten zusammensetzt. Jeder dieser Teilschritte wird durch ein entsprechendes Teilenzym des Multienzymkomplexes katalysiert und kann am isolierten Enzymkomplex (3) spezifisch getestet werden (4, 5).

Genetische Untersuchungen mit spezifischen Fettsäuresynthetase-defizienten Hefe-Mutanten haben ergeben, daß in diesem Organismus der Fettsäuresynthetase-Komplex durch zwei getrennte Genorte, fas 1 und fas 2, kodiert wird (6,7). Eine kombinierte genetische und biochemische Charakterisierung vieler solcher fas-Mutanten hat gezeigt, daß beide fas-Loci aus jeweils mindestens drei DNA-Regionen bestehen, die zusammen für sieben verschiedene Teilfunktionen des Multienzymkomplexes kodieren (8, 9), (Fig. 1).

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese gereinigter, SDS-denaturierter Fettsäuresynthetase ergab trotz der funktionellen Vielfalt dieses Multienzymkomplexes wider Erwarten nur zwei Proteinbanden. Das Molekulargewicht der einen Komponente (Komponente A) wurde mit 185 000, das der anderen (Komponente B) mit 180 000 Daltons bestimmt (10). Aus diesem Ergebnis wurde abgeleitet, daß die Fettsäuresynthetase der Hefe nur aus zwei, jeweils multifunktionellen Polypeptidketten besteht, von denen die eine (Komponente B) durch fas 1, die andere (Komponente A) durch fas 2 kodiert wird (11). Von beiden

a



b

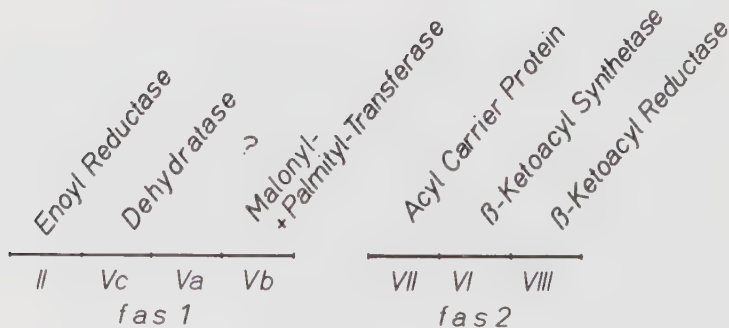


Fig. 1. Hypothetisches Modell des Komplexes (a) und Gen-Enzym-Beziehungen (b) im Fettsäuresynthetase-System der Hefe

Die römischen Zahlen bezeichnen genetische Komplementationsgruppen.

MAL = Malonyl-Transferase, CON = β -Ketoacyl-Synthetase, 1. RED = β -Ketoacyl-Reduktase, DEH = Dehydratase, ENR = Enoyl-Reduktase, PAL = Palmityl-Transferase, SH_c = zentrale SH-Gruppe, SH_p = periphere SH-Gruppe.

fas-Genloci werden komplementierende und nicht-komplementierende Mutanten erhalten (12, 13). Letztere sind cis-dominant und biochemisch pleiotrop, d.h. in ihnen ist keine der Fettsäuresynthetase-Teilaktivitäten mehr nachweisbar. Weiterhin kann aus nicht-komplementierenden fas-Mutanten im Gegensatz zu den komplementierenden der mutierte Enzymkomplex nicht mehr isoliert werden (14).

In der vorliegenden Arbeit sollten einige der sich aus diesen Befunden ergebenden Fragen hinsichtlich der Struktur und Regulation der Synthese des Fettsäuresynthetase-Komplexes der Hefe untersucht werden.

Bezüglich der Regulation der Synthese des Fettsäuresynthetase-Komplexes stellen sich ganz allgemein die folgenden Fragen:

- (i) Unterliegt die Synthese des Fettsäuresynthetase-Komplexes als ganzes einer Kontrolle? Frühere Versuche zu dieser Frage hatten gezeigt, daß der Synthetase-Komplex konstitutiv synthetisiert wird und keiner Repression, etwa durch exogene langkettige Fettsäuren, unterliegt (4, 15).
- (ii) Werden die beiden genetisch nicht gekoppelten fas Gene, fas 1 und fas 2, koordiniert ausgedrückt, etwa entsprechend der Stöchiometrie der Untereinheiten im Komplex?
- (iii) Werden innerhalb eines der beiden fas-Genloci die für die verschiedenen Teilaktivitäten kodierenden DNA-Regionen koordiniert ausgedrückt?

Für beide fas-Gene wurden schon vor längerer Zeit Hinweise für die Beeinflussung des Ausdrucks eines fas-Gens durch das jeweils andere erhalten. So ist z.B. im Extrakt nicht-komplementierender fas 1-Mutanten die fas 2-kodierte β -Ketoacyl-Reduktase völlig inaktiv (8). Da aus nicht-komplementierenden fas-Mutanten kein intakter Fettsäuresynthetase-

Komplex mehr isoliert werden kann, wären zur Klärung der geschilderten Befunde - Abwesenheit von Fettsäuresynthetase-Komplex und Fehlen einer durch den nicht-mutierten fas-Locus kodierten Enzymaktivität - mehrere Möglichkeiten denkbar:

- (i) Das mutierte fas-Genprodukt ist abwesend, das nicht-mutierte anwesend, jedoch besitzt es in nicht-assoziiertem Zustand keine enzymatisch aktive Konformation.
- (ii) Beide fas-Genprodukte liegen zwar noch in der Zelle vor, jedoch haben sie die Fähigkeit verloren, miteinander zu assoziieren und sind demzufolge enzymatisch inaktiv (vgl. i).
- (iii) Die Mutation in einem der beiden fas-Gene bewirkt die Zusammenlagerung der entsprechenden Genprodukte zu einem "abnormalen" und enzymatisch inaktiven Aggregat.
- (iv) Nicht nur das mutierte, sondern beide fas-Genprodukte sind in der Mutanten-Zelle nicht mehr vorhanden. Die Untersuchung der Ursachen eines gleichzeitigen Fehlens von fas 1 und fas 2 Genprodukten könnte Hinweise auf eine koordinierte Regulation der Synthese der beiden Fettsäuresynthetase-Untereinheiten geben.

In der vorliegenden Arbeit sollte im Zusammenhang mit diesen Fragen vor allem untersucht werden, ob in den erwähnten nicht-komplementierenden fas-Mutanten noch einzelne Fettsäuresynthetase-Untereinheiten synthetisiert werden.

In einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit sollten proteinchemische Untersuchungen zur weiteren Stützung der Vorstellung durchgeführt werden, daß der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe tatsächlich aus nur zwei multifunktionellen Untereinheiten besteht (16). Hierbei sollten einmal die Aminosäure-Endgruppen der beiden SDS-Dissoziationsprodukte A und B (vgl. S. 7) bestimmt werden. Zum anderen sollte versucht wer-

den, die Komplex-Untereinheiten durch analytische wie präparative isoelektrische Focussierung diesmal nicht nach Größe, sondern nach Ladungsunterschieden zu trennen. Dabei sollten einmal weitere Hinweise bezüglich des Aufbaus des Fettsäuresynthetase-Komplexes der Hefe gewonnen werden und zum anderen sollten dadurch die Voraussetzungen für eine proteinchemische und biochemische Charakterisierung der isolierten Untereinheiten des Komplexes geschaffen werden.

Erste Versuche in dieser Richtung waren bereits von SCHWIETZ unternommen worden (17). Er hatte festgestellt, daß der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe keine unmaskierten und damit nachweisbaren N-terminalen Aminosäuren enthält (18,19,20). Jedoch konnten durch Carboxypeptidase-Behandlung zwei C-terminale Aminosäuren, nämlich Lys und Val, in nahezu gleichen Mengen nachgewiesen werden (17). Dieser Befund stimmte mit der erwähnten Theorie gut überein, daß die Fettsäuresynthetase der Hefe nur aus zwei Protein-Untereinheiten besteht. Es war jedoch noch zu zeigen, daß diese beiden Aminosäuren jeweils das C-terminale Ende von einer der beiden Fettsäuresynthetase-Komponenten A und B darstellten. Um diese Frage zu klären, sollten die beiden Untereinheiten durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese voneinander getrennt und ihre C-terminalen Gruppen einzeln untersucht werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Folgende Substanzen wurden gekauft: Hefeextrakt, Pepton, Myristinsäure (99% rein, "für biochemische Zwecke"), Agarose, Barbital, Mercaptoäthanol, Polyäthylenglykol, Phenylmethan-sulfonylfluorid (PMSF), Saccharose p.A, Lithiumchlorid und Folin-Ciocalteu-Reagenz (E. MERCK, Darmstadt); Tween 40, N'N'N'N'-Tetramethyläthylendiamin (TMED), Natriumdodecyl-sulfat (SDS), Acrylamid, N'N'-Methylenbisacrylamid, Triton X 100, Coomassie Blue G-250, DEAE-Cellulose (SERVA, Heidelberg); Sephadex G-25, Partikelgröße 50-150 μ , Bettvolumen 5 ml/1 g Trockengel (PHARMACIA, Uppsala); Yeast-Nitrogen-Base (DIFCO, Chicago); 2,5 Diphenyl-Oxazol (PPO), 1,4- bis - 2- (4-Methyl-5-Phenyloxazolyl) -Benzol (POPOP), Soluene 100 (PACKARD-Instruments, Frankfurt); Glusulase (ENDO-Laborato-ries, Garden City N.Y.); Carboxypeptidasen A und B, Protease-Inhibitor A (BOEHRINGER, Mannheim); ^{14}C -Aminosäure-Gemisch (AMERSHAM-BUHLER, Braunschweig); Penicillin G (BAYER, Leverkusen); Ampholine 40% (LKB-Produkte AB, Schweden); 1- ^{14}C -Pantothersäure (spez. Aktivität 1.133×10^6 IpM/uMol) stand zur Verfügung (11)

2. Apparate

Hefezellen wurden vom Kulturmedium durch Sedimentation in einer SORVALL-Zentrifuge Typ RC 2-B (GSA-Rotor, 5 000 UpM) abgetrennt. Volumina über 20 l wurden in einer PADBERG-Durch-laufzentrifuge, Typ GLE, abzentrifugiert.

Der mechanische Aufschluß von Hefezellen durch Schütteln mit Glasperlen erfolgte in einem BRAUN-Zellhomogenisator, Typ MSK, wobei, je nach der aufzuschließenden Zellmenge, 30 ml-Schüttelfläschchen oder 5 ml-Schüttelgläser, letztere in Verbindung mit einem speziellen Adaptor, verwendet wurden (Fa. BRAUN, Melsungen).

Für optische Messungen standen ein EPPENDORF-Filter-photometer, Typ 1001 M, mit Transformationsstufe 1853 und einem Kompensationsschreiber 4412, ein ZEISS Spektrophotometer, Typ PM Q II/M₄ Q III und ein GILFORD Spectralphotometer 250 zur Verfügung

Für präparative Zwecke stand eine BECKMAN-Ultrazentrifuge, Modell L5-65 zur Verfügung.

Die Sterilisation kleiner Volumina (bis 2 l) erfolgte in einem WEBECO-Autoklaven, Typ A 5 (WEBECO & Co., Bad Schwartau). Zur Sterilisation größerer Volumina (5-20 l) diente ein KÜSTER-Standautoklav "Securia", Modell K4. P. (KÜSTER, Berlin).

Als Spannungsquelle bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese dienten die Netzspannungsgeräte 500/100 und 500/500 der Fa. DESAGA, Heidelberg.

Als Spannungsquelle für die Immunelektrophorese wurde ein Netzspannungsgerät der Fa. LKB-Producter, Typ 3290 B, Stockholm, benutzt.

Als Fraktionssammler wurde ein "Ultra-Rac" Gerät der Fa. LKB-Producter AB, Stockholm, verwendet.

Zur Radioaktivitätsmessung diente ein PACKARD-Tricarb-Flüssigkeitsszintillations-Spektrophotometer, Modell 3320. Die verwendete Szintillationsflüssigkeit hatte folgende Zusammensetzung : 14.56 g PPO, 1.4 g POPOP in Toluol/Triton 2:1 ad 1 l.

Zur Gefriertrocknung der Proben stand eine CHRIST-Gefriertrocknungsanlage Beta, Type RD 2, zur Verfügung.

Aminosäure-Analysen wurden im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg von Herrn Dr. SCHILTZ an einem Aminosäure-Analysator BIOTRONIK LC 6 000 durchgeführt.

Zur isoelektrischen Focussierung wurde eine präparative Mikrofocussiersäule (15 ml) verwendet, die eine Eigenanfertigung des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Erlangen-Nürnberg war.

3. Hefestämme

Die in dieser Arbeit benutzten haploiden Hefestämme X 2180-1A (α -Paarungstyp, Wildtyp) und X 2180-1B (α -Paarungstyp, Wildtyp) wurden von Dr. R.K. MORTIMER erhalten. Die davon abgeleiteten Fettsäuresynthetase (fas) -Mutanten stammten aus der Kollektion von Dr. E. SCHWEIZER (4).

4. Medien

(a) Hefeextrakt-Pepton-Medium (YEP)

Feste Nährböden: 1% Glukose, 0.3% Pepton, 0.26% Hefeextrakt, 2% Agar, 0.5% K_2HPO_4 , 0.5% KH_2PO_4 .

Flüssigmedium: 2% Glukose, 0.6% Pepton, 0.4% Hefeextrakt, 0.5% K_2HPO_4 , 0.5% KH_2PO_4 .

20 Liter-Ansätze: 2% käufl. Haushaltszucker (Saccharose), 0.3% Pepton, 0.15% Hefeextrakt, 0.5% K_2HPO_4 , 0.5% KH_2PO_4 .

Der Zucker wurde in 2 l H_2O dest., Pepton und Hefeextrakt in je 1 l H_2O dest., die Salze in 17 l H_2O dest. getrennt sterilisiert und erst direkt vor dem Animpfen vereinigt.

(b) Hefeextrakt-Pepton-Fettsäure-Medium (YEP-FS)

Zusammensetzung von Fest- und Flüssigmedien, sowie von 20 l-Ansätzen wie unter (a), jedoch zusätzlich Zugabe von jeweils 1% Tween 40 und 0.03% Butterhydrolysat. Butterhydrolysat wurde wie folgt hergestellt: 100 g Butter wurden zusammen mit 25 g KOH-Plätzchen (gelöst in 50 ml Methanol) 3 h unter Rückfluß erhitzt. Das entstandene Produkt, eine nach dem Abkühlen halb feste Masse, wurde direkt eingesetzt.

(c) Minimal-Medium (MIN)

0.67% Nitrogen Base, 2% Glukose, 0.5% K_2HPO_4 , 0.5% KH_2PO_4 , 0.03% Myristinsäure, 1% Tween 40.

(d) Sporulations-Medium (1 l)

0.7% Natrium-Acetat, 1.86 g KCl.

(e) Citrat-Medium

Zur Markierung von Fettsäuresynthetase mit radioaktiver Pantothenensäure wurde die Hefe in einem von MÜCKE (21) beschriebenen synthetischen Medium angezüchtet.

Ein 1-Liter-Ansatz dieses Medium wurde aus folgenden Stammlösungen hergestellt:

- (i) 100 g Zucker gelöst in 200 ml H_2O dest.
- (ii) 10 g Citronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 1.1 g KH_2PO_4 , 0.85 g KCl, 0.25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.16 g $CaCl_2 \cdot 7H_2O$, 5 mg $MnSO_4$, 5 mg $FeCl_3$, 10 g Tween 40 und 0.3 g Myristinsäure. H_2O ad 700 ml. Einstellung von pH 5.0 am pH-Meter mit KOH.
- (iii) 7.5 g Ammoniumsulfat gelöst in 100 ml H_2O .
- (iv) 2 ml Vitaminlösung, enthaltend 0.5 mg Thiamin, 0.5 mg Pyridoxin, 50 mg Inosit und 40 μg Biotin.
- (v) 0.02 ml (4 μ Curie) einer ^{14}C -Pantothenensäurelösung (spez. Akt. 1.35×10^6 IpM/ μ Mol).

Die Lösungen (i) - (iii) wurden getrennt jeweils 50 min bei 1.2 atü und $120^\circ C$ autoklaviert, auf Raumtemperatur abgekühlt und dann vereinigt. Zu dieser Mischung wurden die Vitamin- und die Pantothenensäurelösungen unsteril zugegeben.

20-Liter-Ansätze wurden aus folgenden Stammlösungen hergestellt:

- (i) 800 g käufl. Haushaltszucker (Saccharose) gelöst in 200 ml H_2O gelöst.

- (ii) 200 g Citronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 22 g KH_2PO_4 , 17 g KCl, 5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g $CaCl_2 \cdot 7H_2O$, 100 mg $MnSO_4$, 100 mg $FeCl_3$, 3 g Myristinsäure, 100 g Tween 40 und 150 g Ammoniumsulfat. H_2O ad 18 l.
- (iii) 10 ml Vitaminlösung mit 10 mg Thiamin, 10 mg Pyridoxin, 100 mg Inosit und 80 μ g Biotin.
- (iv) 0.1 ml (20 μ Curie) einer ^{14}C -Pantothensäurelösung (spez. Akt. 1.135×10^6 IpM/ μ Mol).

Die Lösungen (i) und (ii) wurden wiederum getrennt autoklaviert, abgekühlt und dann vereinigt. Danach wurden die Vitamin- und die Pantothensäurelösung unsteril zugegeben.

Allgemein wurden Medien bis zu einem Volumen von 2 l 50 min bei 1.2 atü/120°C sterilisiert, während größere Volumina (5-20 l) 2.5 Stunden bei 1.1 atü/110°C sterilisiert wurden.

5. Herstellung der diploiden Stämme fas 1-155/fas 2-180 und fas 1-270/fas 2-180

Auf YEP-FS-Agar wurden die haploiden Elternstämme (fas 1-155, fas 1-270 und fas 1-358 (a-Typ) sowie fas 2-180 his - α -Typ) getrennt aufgetragen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden ungefähr gleiche Mengen von Zellen beider Stämme auf derselben Platte mit einem sterilen Zahnstocher innig verrieben und das Paarungsgemisch wiederum über Nacht bei 30°C inkubiert. Danach wurde die Kreuzung auf eine MIN-Platte überstempelt (22) und diese 2 Tage bei 30°C inkubiert. Hierbei wachsen auf dem MIN-Agar nur die komplementierenden diploiden Zellen aus. Diese wurden nach entsprechender Verdünnung auf einer neuen MIN-Platte kloniert und ein dabei isolierter gut gewachsener Einzelklon für die Untersuchungen eingesetzt.

6. Herstellung von fas 1/fas 2-Doppelmutanten

Auf einer YEP-FS-Agarplatte wurden Paarungstyp a-Mutanten der fas-Komplementationsgruppe III (fas 1-505, fas 1-42 und fas 1-195) mit Paarungstyp α -Mutanten der fas-Komplementationsgruppe IV (fas 2-125 und fas 2-109) gekreuzt (vgl. vorangegangenen Abschnitt). Nach Inkubation über Nacht wurden die Paarungsgemische auf YEP-Agar überstempelt und dort weitere 2 Tage bei 30°C inkubiert. Die dabei auswachsenden Zellen wurden in einer Verdünnung von ca. 100 Zellen/Platte auf YEP-Agar ausgestrichen und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Einer der dabei auswachsenden Einzelklone wurde in Sporulationsmedium überführt und in einer vertikal rotierenden Trommel (NEW BRUNSWICK, Rollerdrum M TC-5-260 TT 16) bei 30°C bebrütet. Dabei erfolgte gewöhnlich nach 2-5 Tagen die Sporulation eines großen Teils der Diploiden. Die 3 h mit 1:10 verdünnter Glusulase behandelten Asci wurden zur "random spore" Isolierung auf YEP-FS-Agarplatten ausgestrichen, dort bei 30°C inkubiert und die auf Grund ihrer Kleinheit als ausgekeimte Einzelsporen angesehenen Kolonien auf einer neuen YEP-FS-Agar Stammpalte aufgereiht. Diese Stammpalte wurde auf YEP-Agar überstempelt und der Abdruck 2 Tage bei 30°C inkubiert. Fettsäure-bedürftige Klone wurden mit fas 1-505, fas 1-42 und fas 1-195 (Kompl.-Gr. III) und fas 2-125 und fas 2-109 (Kompl.-Gr. IV) Stämmen beider Paarungstypen gekreuzt. Mutanten, die in keiner der 4 Kreuzungen positive Komplementationen zeigten, wurden als fas 1/fas 2-Doppelmutanten isoliert.

7. Hefeanzucht

(a) Anzucht homogener, genetisch definierter Kulturen

Von jedem in einem größeren Volumen anzuzüchtenden Hefestamm wurde zunächst ein genetisch reiner Klon isoliert. Dazu wurden die Zellen des betreffenden Stammes auf YEP-FS-Agar ausplattiert (ca. 200 Zellen/Platte) und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Dabei wuchsen die ausplattierten Zellen zu sicht-

baren Klonen aus. Bei fas-Mutanten wurde an dieser Stelle der Mutantencharakter durch Überstempeln der YEP-FS-Platte auf YEP-Agar überprüft. Ein einzelner Klon des gewünschten, überprüften Genotyps wurde dann in 10 ml YEP-FS-Flüssigmedium überimpft und dieses 24 h bei 30°C inkubiert. Mit dieser Kultur wurde dann 1 l YEP-FS-Medium beimpft und für 24-36 h bei 30°C inkubiert. Eine solche, gut gewachsene und kräftig CO₂-entwickelnde, 1 l-Kultur diente dann als Inokulum für jeweils einen 20 l-Ansatz. Nach dem Beimpfen wurden die 20-l-Kolben unter gelegentlichem Umschütteln 24-36 h bis zum Erreichen der spätlogarithmischen Wachstumsphase (sehr starke CO₂-Entwicklung) bei 30°C inkubiert. Die Hefezellen wurden dann bei 15 000 UpM in einer PADBERG-Modell GLE-Durchlaufzentrifuge abzentrifugiert und zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Aus 20 l YEP-FS-Medium wurden auf diese Weise gewöhnlich 90 g feuchtgepackte Hefezellen erhalten. Vor der Weiterverwendung der Zellen wurde jeweils noch eine Revertantenkontrolle durchgeführt. Dazu wurde 1 Tropfen Zellsuspension auf eine YEP-FS-Agarplatte gebracht, die zuvor mit 0.1 ml Penicillinlösung behandelt wurde (1.5 mg Penicillin G, K-Salz, in 1 ml sterilem Wasser gelöst). Nach 12 h Inkubation bei 22°C wurde die YEP-FS-Platte auf YEP-Agar überstempelt, der Abdruck 2 Tage bei 30°C inkubiert und danach auf Revertanten überprüft.

(b) Markierung von Hefezellen mit ¹⁴C-Pantothensäure

Die Zellen eines gemäß 7 (a) hergestellten 10 ml-Inokulums wurden abzentrifugiert, mit sterilem dest. Wasser von anhaftendem Vollmedium freigewaschen und in 1 l ¹⁴C-Pantothensäure enthaltendes Citrat-Medium gegeben. Nach 24-36 h Inkubation bei 30°C wurde die dann gewöhnlich in kräftigem exponentiellem Wachstum befindliche Kultur als Inokulum für einen 20 l-Ansatz von ¹⁴C-Pantothensäure-markiertem Medium benutzt. Nach dem Beimpfen wurden die 20 l Kulturen zunächst bei 30°C 24 h ohne zusätzliche Belüftung stehengelassen und anschließend bei der gleichen Temperatur für weitere 12 h belüftet. Danach wurden die Hefezellen bei 5 000 UpM (Sorvall, GSA-Rotor) abzentrifu-

giert und zweimal mit H_2O dest. gewaschen. Aus 20 l Citrat-medium wurden auf diese Weise gewöhnlich ca. 100 g feuchtgepackte Hefezellen erhalten.

(c) Markierung von Hefezellen mit ^{14}C -Aminosäuren

Zur radioaktiven Markierung der zellulären Proteine wurden die Hefezellen in MIN-Medium angezüchtet, das je 20 mg der Aminosäuren Ala, Leu, Ile, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val sowie 16 μCi ^{14}C -Aminosäure-Gemisch (AMERSHAM 57 mCi/mAtom Carbon) enthielt.

8. Aufschluß der Hefezellen

12 g feuchtgepackte Hefezellen wurden zusammen mit 20 ml 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5, der 0.01 M K-EDTA enthielt und 30 g, auf $-15^{\circ}C$ vorgekühlter Reflexperlen, Größe 31/6 (DRAGON-Werk, G.Wild, Bayreuth) in einem BRAUN-Zellhomogenisator zweimal für jeweils 15 sec geschüttelt. Um eine Erwärmung des Homogenisats zu vermeiden, wurden die Proben zwischen den beiden Schüttelvorgängen jeweils für mindestens 5 min wieder in Eis gekühlt. Nicht aufgeschlossene Zellen, grobe Zelltrümmer und Glasperlen wurden anschließend durch 10 min Zentrifugation bei 8 000 x g (SORVALL, GSA-Rotor, 7 000 UpM) abgetrennt.

9. Fettsäuresynthetase-Isolation

- (a) Wildtyp-Fettsäuresynthetase und Mutanten-Fettsäuresynthetase mit Wildtyp-artiger Proteinstruktur wurden aus den Hefezellen mit nur geringfügigen Veränderungen nach der von LYNEN beschriebenen Methode (24, 23, 11) isoliert.
- (b) Die Anreicherung von abnormalem, nicht Wildtyp-artigem, Fettsäuresynthetase-analogen kreuzreagierenden Material, das in bestimmten nicht-komplementierenden fas-Mutanten nachweisbar ist, kann nach dem obigen Reinigungsschema

nicht durchgeführt werden. Es wurde versucht, dieses Material nach folgender Methode anzureichern: Der Aufschluß der Hefezellen, die 1. Ammonsulfat-Fraktionierung, die Ca-Phosphatgel-Adsorption sowie die 2. Ammonsulfat-Fraktionierung erfolgten nach der für das Wildtyp-Enzym üblichen Methode (23, 24). Danach anschließend wurde jedoch die 2. Ammonsulfat-Fällung an DEAE-Cellulose chromatographiert. Dazu wurde der Niederschlag in 2 ml 0.01 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.5 gelöst und 4 h gegen 2 l dieses Puffers dialysiert. Danach wurde die Probe auf eine DEAE-Cellulose-Säule (18 cm x 1.5 cm) aufgetragen und mit je 50 ml der folgenden Kaliumphosphat-Puffer pH 6.5 stufenweise eluiert: 0.01 M, 0.075 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M und 0.4 M (25-29). Mit einem Fraktionssammler wurden Fraktionen zu je 2.5 ml aufgefangen und ihr Proteingehalt spektralphotometrisch bei 280 nm bestimmt. Die so erhaltenen, verschiedenen Proteinfraktionen wurden jeweils mit 55 g/100 ml Ammonsulfat versetzt und das dabei ausfallende Protein abzentrifugiert (19 000 x g, SORVALL, SS 34 Rotor). Der Niederschlag wurde in 0.5 ml 1/15 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.5 aufgenommen und durch Immundiffusions-Analyse unter Verwendung von spezifischem Fettsäuresynthetase-Antiserum diejenige Fraktion ermittelt, die das Fettsäuresynthetase-CRM enthielt. Mit dieser Fraktion wurde zur weiteren Reinigung eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt.

10. Protein-Bestimmungen

- (a) Proteinbestimmungen erfolgten nach der bei BEISENHERZ et al. beschriebenen BIURET-Methode (30,31). Danach wurden 1-5 mg Protein in 2 ml Wasser mit 0.2 ml 3 M Trichloroessigsäure ausgefällt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in einer Lösung aus 2.5 ml dest. Wasser und 2.5 ml BIURET-Reagenz (s.u.) aufgelöst. Nach der vollständigen Lösung des Proteins wurde die Extinktion bei 540 nm in einer Küvette mit der Schichtdicke $d=2$ cm gemessen.

Als Nullwert diene eine Lösung, die kein Protein enthielt, sonst aber genau gleich behandelt worden war. Die Proteinkonzentration ergab sich aus der Formel

$$P = \frac{E \cdot k}{V} \text{ (mg/ml),}$$

wobei E die gemessene Extinktion, V das Volumen der Probe in ml und k einen angenäherten Proportionalitätsfaktor vom Wert 8.5 bedeuten.

Die verwendete Reagenzlösung wurde folgendermaßen hergestellt: 400 ml einer - möglichst karbonatfreien - 0.2 N NaOH-Lösung werden mit 9 g Seignette-Salz und 3 g feinstgepulvertem CuSO_4 versetzt. Dann gibt man 5 g KJ dazu und füllt mit 0.2 N NaOH-Lösung auf 1 l auf.

- (b) Die Bestimmungen geringer Proteinnengen (5-10 mg in 1-5 ml H_2O) wurden wegen der in diesem Bereich zu großen Unempfindlichkeit der BIURET-Methode nach WARBURG und CHRISTIAN (32) bestimmt, indem die gegenüber dem Untergrund bei 280 nm gemessenen Absorptionswerte mit dem für Fettsäuresynthetase charakteristischen Faktor 1.1 (E. SCHWEIZER, unveröffentlichte Versuche) multipliziert wurden. Dabei erhält man den Proteingehalt in mg/ml.
- (c) Proteinbestimmungen nach der LOWRY-LOPEZ-Methode (33). Dieses Verfahren ist sehr empfindlich. Es beruht auf der Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagenz durch aromatische Aminosäuren. Zu 0.2 ml Probe gibt man 1 ml Cu-Tartrat-Reagenz, bestehend aus 50 ml Reagenz 1 (40 g Na_2CO_3 in 500 ml 0.1N NaOH) und 1 ml Reagenz 2 (0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ und 1.0 g K-Na-Tartrat in 100 ml 0.1 N NaOH), mischt und läßt 10 min bei Raumtemperatur stehen. Dann fügt man 0.1 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz zu, mischt gut durch und mißt nach 30 min die Absorption bei 578 nm. Eine Standard-Kurve wurde mit sterilisiertem Rinderserumalbumin hergestellt (E (10 μg Protein) = 0.07).

11. Enzymtests

Die Fettsäuresynthetase-Gesamtreaktion (1,34), die β -Ketoacyl-Reduktase und Enoyl-Reduktase-Teilaktivitäten wurden, wie von KÜHN (11) und KNOBLING (35) im einzelnen beschrieben, getestet.

12. Immunpräzipitation von Fettsäuresynthetase in Hefezellen-Rohextrakten (36-40)

Jeweils 5 g frisch geerntete Hefezellen wurden in 3 ml 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5, enthaltend 1 mg/ml PMSF und 1 mg/ml Protease-Inhibitor A, suspendiert und 2 Mal je 15 sec bei 4°C im BRAUN-Homogenisator mit Glasperlen geschüttelt. Die Glasperlen und grobe Zelltrümmer wurden 30 min bei 27 000 x g (BECKMAN, JA 20, 15 000 UpM) abzentrifugiert. Zu dem Überstand wurde Ammoniumsulfat bis zur Endkonzentration von 55 g/100 ml zugegeben und 1 h bei 4°C weitergerührt. Nach 30 min Zentrifugieren bei 28 000 x g (BECKMAN, JA 20 Rotor, 16 000 UpM) wurde der Niederschlag in 1 ml 0.02 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.5 aufgelöst und 2 h gegen den gleichen Puffer dialysiert.

Das Dialysat wurde nochmals 30 min bei 28 000 x g klarzentrifugiert und anschließend für 24 h mit 0.5 ml Fettsäuresynthetase-Antiserum im Kühlraum inkubiert.

Das gebildete Immun-Präzipitat wurde 15 min bei 5 000 x g abzentrifugiert und anschließend mit 0.2 ml 10%iger SDS-Lösung, 0.05 ml Mercaptoäthanol und 0.2 ml H₂O versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein aliquoter Teil der so erhaltenen Proben wurden durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese untersucht (s.u.).

13. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

(a) Analytische SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele, die 4.1% Acrylamid, 0.1% SDS und 6 M Harnstoff enthielten, wurden folgendermaßen hergestellt (41,42,43):

In einem Becherglas wurden 2.7 g Harnstoff, 1.4 ml Acrylamid-Stammlösung (22.2 g Acrylamid, 0.6 g Methylen-Bisacrylamid, H_2O dest. ad 100 ml), 0.3 ml dest. Wasser, 3.7 ml Puffer, (8.88 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 51.5 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 2 g SDS, H_2O ad 1 000 ml) und 0.012 ml TEMED gemischt, die klare Lösung mit 0.1 ml Ammoniumperoxidisulfat-Lösung (70 mg/l) versetzt, in Gelröhrchen (10 x 0.4 cm) pipettiert und mit dest. Wasser überschichtet. Die Gele waren gewöhnlich nach ca. 30 min Stehen bei Zimmertemperatur polymerisiert.

Der benutzte Elektrodenpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 8.88 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 51.1 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 2 g SDS, H_2O ad 2 000 ml. Der Puffer wurde jeweils nur 1 Mal benutzt.

Die zu untersuchenden Proben, die zwischen 10 und 100 μg Fettsäuresynthetase enthielten, wurden in je 0.1 ml 0.5% SDS/0.02 M Na-Phosphat pH 7.5 nach Zugabe von 1/10 Volumen Mercaptoäthanol 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Dichte der Lösung durch Zugabe von festem Harnstoff oder Saccharose erhöht und maximal 0.2 ml Probe jeweils auf ein zylindrisches Polyacrylamidgel aufgesetzt. Die Elektrophorese-dauer betrug bei 20 V und Raumtemperatur 15-20 h. Danach wurden die Gele aus den Glasröhrchen herausgelöst, in Coomassie-Blau G-250-Färbelösung (0.05% Coomassie-Blau G-250 in Methanol/Eisessig 5:5:1) 2 h gefärbt (44) und dann mit 7.5% Essigsäure/5% Methanol entfärbt. Die nach etwa 24 h entfärbten Gele wurden in Reagenzgläsern nach UHLENHUT, welche mit Entfärbelösung gefüllt und mit Parafilm verschlossen wurden. aufbewahrt.

(b) Präparative SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur präparativen Trennung der Fettsäuresynthetase aus Hefezellen-Rohextrakten wurden große Rundgele (13 x 3 cm) der in (a) beschriebenen Zusammensetzung hergestellt. Die Proben enthielten bis zu 1 ml Rohextrakt.

Die präparative Trennung gereinigter Fettsäuresynthetase wurde in Flachgelen (DESAGA bzw. HOEFER-Instruments) der gleichen Gelzusammensetzung durchgeführt. Die Proteinproben (ca. 1 mg Fettsäuresynthetase) wurden über die ganze Gelfläche aufgetragen. Die Elektrophoresedauer betrug hierbei ca. 48 h. Beim Vergleich mehrerer verschiedener Fettsäuresynthetase-Präparationen wurde ein Flachgel in Verbindung mit einem Gelkamm mit 10 Taschen (HOEFER-Instruments) verwendet. Die Färbung und Entfärbung der Gele erfolgte wie in (a) beschrieben.

14. Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in SDS-Gelen

Nach dem Anfärben der Protein-Banden mit Coomassie-Blau, wie in Abs. 13 beschrieben, wurden die Gele in einer Methanol/Trockeneis-Kältemischung eingefroren. Große Rundgele (13 x 13cm) wurden dann mit einer RITTER-Haushalts-Brotmaschine, Stufe 2, in feine Scheiben (ca. 0.5 mm) zerschnitten. Jede Scheibe wurde in ein PACKARD-Zählgläschen überführt und mit 2.5 ml SOLUENE 100 über Nacht bei 50°C unter leichtem, rotierendem Schütteln inkubiert. Danach wurden in jedes Gläschen 18 ml Zählflüssigkeit (Triton/Toluol 1:2, 14.56 g PPO, 1.4 g POPOP pro Liter) sowie 0.3 ml Eisessig gegeben und gut durchgemischt. Anschließend wurde die Radioaktivität der einzelnen Proben im TRICARB-Szintillationszähler untersucht.

15. Carboxyl-Endgruppenbestimmung der Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B durch Carboxypeptidase-Behandlung (45,46)

Je 2.5 mg gereinigter fas 1-192 Fettsäuresynthetase wurden auf 2 SDS-Flachgele aufgetragen und 60 h bei 20 Volt elektrophoretisiert. Alle verwendeten Geräte waren zuvor mit Chrom-

schwefelsäure gereinigt worden. Bei allen Manipulationen wurden Handschuhe benutzt. Nach der Elektrophorese wurden zur Lokalisation der Protein-Banden jeweils 1 cm breite Streifen aus der Mitte, vom linken und vom rechten Rand des Gels herausgeschnitten und mit Coomassie-Blau möglichst rasch angefärbt (10 min Färb- und 30 min Entfärbedauer). Nach Extrapolation von den gefärbten auf die ungefärbten Gelteile wurden aus dem ungefärbten Gel die Fettsäuresynthetase-Banden A und B getrennt herausgeschnitten und mit dest. Wasser das Gel kurz nachgespült, um überschüssiges SDS zu entfernen. Mit einem Glasstab wurden dann die Gelstücke fein zerrieben und zu dem erhaltenen Gelbrei jeweils 20 µg der Carboxypeptidasen A und B, beide zusammen gelöst in 2 ml 0.01 M Tris. HCl pH 7.5 dazugegeben. Nach 7 min Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.2 ml 3 M Trichloressigsäure (TCA) gestoppt und das ausgefällte Protein zusammen mit den Gelresten in einer CHRIST-Tischzentrifuge bei 3 000 UpM 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Entfernung der TCA zweimal mit je 2 ml Äther ausgeschüttelt. Die nahezu neutrale wässrige Phase wurde gefriergetrocknet und als ganzes zur Aminosäure-Analyse eingesetzt.

16. Isoelektrische Focussierung von gereinigter Fettsäure-Synthetase

(a) Focussierung im Polyacrylamidgel (47,48)

Die Polyacrylamidgele für die isoelektrische Focussierung hatten folgende Zusammensetzung: Pro Gel wurden 0.5 ml Acrylamidlösung (29.1 g/100 ml), 0.5 ml Bisacrylamidlösung (0.9 g/100 ml), 1.8 ml 6 M Harnstoff, 0.14 ml Ampholine 40%, pH 5-10, 0.01 ml Ampholine pH 3-6, 0.01 ml Ampholine pH 5-8, 0.02 ml Ampholine pH 7-10 und 0.02 ml Riboflavinlösung (4 mg/100 ml) zusammengemischt und an der Wasserstrahlpumpe entgast. Zur Polymerisierung wurden die Gele ca. 1 h im Tageslicht stehengelassen.

Die zu untersuchende Proteinlösung wurde bis zu einer Endkonzentration von 6 M mit festem Harnstoff versetzt und 30 min bei 25°C stehengelassen. Als Probe wurde pro Gel ein Gemisch aus ca. 0.1 ml Proteinlösung ($\sim 100 \mu\text{g}$) enthaltend 35% Saccharose, sowie dem gleichen Volumen einer 2% Ampholinlösung aller verwendeten pH-Bereiche enthaltend 35% Saccharose aufgetragen (Endvolumen ca. 0.2 ml). Mit einer Spritze wurde diese Probe zum Schutz vor dem Kontakt mit einer Elektrodenlösung mit 0.1 ml einer 1% Ampholinlösung aller verwendeten pH-Bereiche, enthaltend 15% Saccharose, überschichtet. Anschließend wurden die Gelröhrchen bis zum oberen Rand mit der Anodenlösung überschichtet.

Als Anodenlösung wurde 0.25 M Schwefelsäure und als Kathodenlösung 0.25 M NaOH verwendet.

Die 24 h dauernde Focussierung wurde bei 0.5 mA/Gel gestartet. Die Stromstärke wurde mehrere Male nachgestellt bis zu der Endspannung von 300 Volt. Nach der Focussierung wurden die Gele über Nacht in einer 5% TCA und 5% Sulfosalicylsäure enthaltenen Lösung fixiert und anschließend wie in Material und Methoden, Abs. 13, beschrieben, angefärbt und entfärbt.

Zur Bestimmung des pH-Gradienten im Gel wurde das Rundgel nach der Focussierung mit einer Gelschneideapparatur in ca. 20 Scheiben von jeweils ca. 1 mm Dicke geschnitten. Zu jeder Scheibe wurden 0.5 ml H_2O gegeben und über Nacht stehengelassen. Mit einer Mikroelektrode wurde danach der pH-Wert der überstehenden Lösung gemessen (Fig. 25).

(b) Präparative Mikrofocussierung nach OSTERMANN (49)

Für die Durchführung der Focussierung wurden die folgenden vier Ausgangslösungen benötigt:

- (1) Anodenlösung (schwer) bestehend aus 0.1 ml H_2SO_4 konz., 7 ml H_2O bidest. und 6 g Saccharose.
- (2) Kathodenlösung (leicht) bestehend aus 0.1 g NaOH und 10 ml H_2O bidest.
- (3) Gradientenlösung (schwer) bestehend aus 0.75 ml Ampholine 40% pH 3-10, 7.75 ml H_2O bidest., 5.6 g Saccharose und 2.9 g Harnstoff.
- (4) Gradientenlösung (leicht) bestehend aus 0.25 ml Ampholine 40% pH 3-10, 11.75 ml H_2O bidest. und 4.32 g Harnstoff.

Die jeweilige Probe (ca. 100-200 μg Protein) wurde nach 2 h Dialyse gegen 10^{-4}M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.5 in die leichte Gradientenlösung eingeührt.

Füllung der Focussier-Säule (13 x 1.5 cm):

Mit einer LKB-Multiperpex-Pumpe, Modell 2115, wurden 2 ml der schweren Elektrodenlösung von unten her in die Säule gepumpt. Mit einem Gradientenmischer wurde anschließend über dieser Lösung, die die untere Elektrode gut bedecken muß, ein Gradient aus je 5.5 ml der schweren und leichten Gradientenlösung aufgebaut. Dabei muß das Schlauchende in der Focussiersäule mit steigendem Flüssigkeitsspiegel manuell stufenweise höhergezogen werden, so daß der Ausfluß stets ca. 2 mm über dem Niveau des Gradienten endet.

Anschließend wurde die leichte Elektrodenlösung über diesen Gradienten gepumpt, so daß sich eine deutliche Phasentrennung ergab. Dabei muß das Schlauchende dicht über dem Flüssigkeitsspiegel gehalten werden. Der Füllvorgang ist beendet, wenn die obere Elektrode gut in die Lösung eintaucht.

Während der 48 h dauernden Focussierung betrug die Stromstärke konstant 0.5 mA. Sie mußte auf diesen Wert mehrmals nachgestellt werden. Dabei stieg die Spannung in der Regel von 30 Volt zu Beginn bis auf 300 Volt am Ende an. Nach der Focussierung wurde die Spannung langsam schrittweise reduziert und nach dem Schließen des oberen Luftweges wurde der Säuleninhalt über eine Multiperpex-Pumpe in Fraktionen zu je 15 Tropfen aufgefangen und deren Absorption bei 280 nm im Spektralphotometer gemessen.

III. E R G E B N I S S E

A. UNTERSUCHUNGEN ZUR KONTROLLE DES AUSDRUCKS DER FETTSÄURE-SYNTHESE-GENORTE

1. Nachweis der fas 1 und fas 2 Genprodukte durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Hefezellen-Rohextrakten

Ziel einer ersten Versuchsreihe war es, eine Methode zu finden, die es erlaubt, den Rohextrakt von Hefezellen auf Anwesenheit oder Abwesenheit von fas 1 und fas 2 Genprodukten in bestimmten Fettsäuresynthetase-Mutanten qualitativ und, wenn möglich, auch quantitativ zu untersuchen. Damit sollten einzelne Untereinheiten des Komplexes auch noch nachweisbar sein, selbst wenn andere Untereinheiten und damit der intakte Komplex nicht gemacht werden können. Bei dem ungewöhnlich hohen Molekulargewicht der beiden Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B erschien es möglich, sie durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von den übrigen Proteinen des Zell-extraktes abzutrennen und so spezifisch nachzuweisen.

Es ist z.B. bekannt, daß in E. coli auf diese Weise die beiden RNA-Polymerase-Untereinheiten β und β' , die ein ähnlich hohes Molekulargewicht wie die Fettsäuresynthetase-Untereinheiten der Hefe besitzen, nachgewiesen und untersucht werden können (50).

(a) Vorversuche mit Wildtyp-Zellen

Nach dem Aufschluß der Zellen durch Schütteln mit Glasperlen in Gegenwart von SDS, Harnstoff und Mercaptoäthanol wurde zunächst der gesamte Rohextrakt mit sämtlichen löslichen hoch- wie niedermolekularen Zellinhaltsstoffen zur Elektrophorese eingesetzt. In diesem Fall war jedoch das Gel praktisch über seine ganze Länge gleichmäßig gefärbt. Somit war es unmöglich, in ihm die der Fettsäuresynthetase entsprechenden Linien zu entdecken (nicht gezeigt).

Um eine selektive Vorweganreicherung der Fettsäuresynthetase-Untereinheiten zu erreichen, wurde daher in einem weiteren Versuch der Wildtyp-Rohextrakt über eine mit Harnstoff und SDS äquilibrierte Sepharose 4 B Säule filtriert. Dabei wurde zwar ein definiertes Elutionsprofil erhalten (Fig. 2a), jedoch zeigten sich selbst nach Konzentrierung der Gipfelfraktionen (Nr. 20-22) mit Polyäthylenglykol keine Fettsäuresynthetase-ähnlichen Linien im SDS-Polyacrylamidgel (Fig. 2b).

Da das Fehlen der charakteristischen Fettsäuresynthetase-Banden durch Wirkung SDS-resistenter-Proteasen bedingt sein konnte, wurde versucht, dies auszuschließen, indem der Rohextrakt sofort nach dem Zellaufschluß mit 1/5 Volumen Trichloroessigsäure versetzt wurde. Nach Abzentrifugieren wurde versucht, den Protein-Niederschlag mit Harnstoff-haltigem Puffer wieder zu lösen. Bei der anschließenden SDS-Gelelektrophorese wurde zwar oft ein Fettsäuresynthetase-ähnliches Bandenmuster an der erwarteten Stelle im Gel beobachtet (Fig. 3b), dieses ließ sich jedoch in verschiedenen Präparationen nur sehr unbefriedigend reproduzieren (vgl. Fig. 3b und c). Offenbar war die Löslichkeit der gefällten Proteine generell sehr schlecht und von Präparation zu Präparation verschieden.

Deutliche und reproduzierbare Proteinlinien an den für die Fettsäuresynthetase-Banden charakteristischen Stellen im Gel wurden jedoch erhalten, wenn zunächst durch Sephadex G-25 Filtration der Rohextrakt salzfrei gemacht wurde und die in Fig. 4a gezeigten Protein-Fraktionen dann der SDS-Gelelektrophorese unterworfen wurden (Fig. 5a). In einem Kontrollexperiment war ^{14}C -Pantothensäure-markierte, gereinigte Wildtyp-Synthetase einem unmarkierten fas-Mutanten-Rohextrakt zugesetzt und mit ihm über Sephadex G-25 filtriert worden. Fig. 4b zeigt, daß wie erwartet, die Positionen von Radioaktivität und Proteingipfel gut übereinstimmen. Damit ist sichergestellt, daß die zur SDS-Gelelektrophorese eingesetzten Fraktionen (Fr. 19-22) auch tatsächlich die Fettsäuresynthetase enthalten. Weiterhin wurde auch noch gereinigte, radioaktiv markierte Fettsäuresynthetase allein über Sephadex G-25 filtriert. Dabei wurde dasselbe Elutionsprofil beobachtet wie bei der Mischung aus

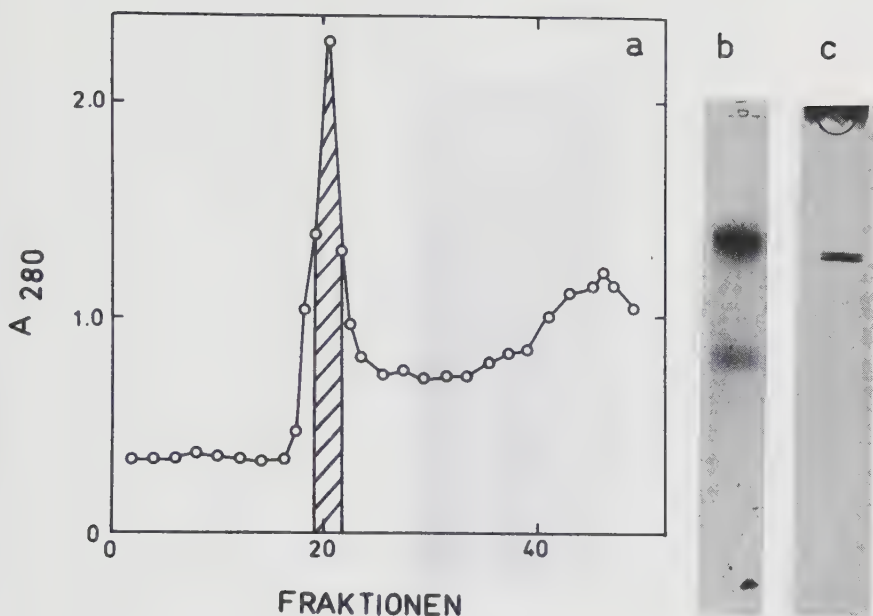


Fig. 2. Nachweis von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten im Heferohextrakt nach Chromatographie an Sepharose 4 B

5 g Zellen wurden in 3 ml 6 M Harnstoff suspendiert, durch 2 x 15 sec Schütteln mit Glasperlen aufgeschlossen und der durch Zentrifugation von Glasperlen und Zelltrümmern befreite Überstand nach Zusatz von 5% SDS und 10% Mercaptoäthanol 5 min bei 75°C inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt auf eine Sepharose 4 B Säule (80 cm x 1.6 cm) aufgetragen und die Säule dann mit 6 M Harnstoff, 1% SDS und 1% Mercaptoäthanol eluiert. Das Volumen der einzelnen Fraktionen betrug 2.0 ml. Die durch Schraffierung gekennzeichneten Fraktionen wurden durch 2 h Dialyse gegen 20% Polyäthylenglykol und 1% SDS auf 0.2 ml eingengt und wie in Material und Methoden beschrieben der SDS-Gelelektrophorese unterworfen (b). Ein Kontrollgel enthält gereinigte Wildtyp-Fettsäuresynthetase (c).

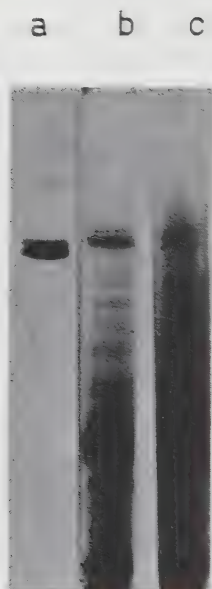


Fig. 3. SDS-Gelelektrophorese Trichloressigsäure-behandelter Wildtyp-Extrakte

5 g Hefezellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben aufgeschlossen. Der nach dem Abzentrifugieren erhaltene Extrakt (ca. 4 ml) wurde mit 1/5 Vol. Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Die abzentrifugierte Fällung wurde 3 x mit je 1.5 ml Aceton ausgewaschen und anschließend 30 min. bei 25°C in einer Mischung aus 0.5 ml 6 M Harnstoff und 0.5 ml 10% SDS digeriert, vom Unlöslichen abzentrifugiert und pro Gelröhrchen 0.4 ml des klaren Überstandes zur Elektrophorese aufgetragen.

- a) Gereinigtes Wildtyp-Enzym
- b) TCA-behandelter Wildtyp-Extrakt, 1. Präparation
- c) TCA-behandelter Wildtyp-Extrakt, 2. Präparation

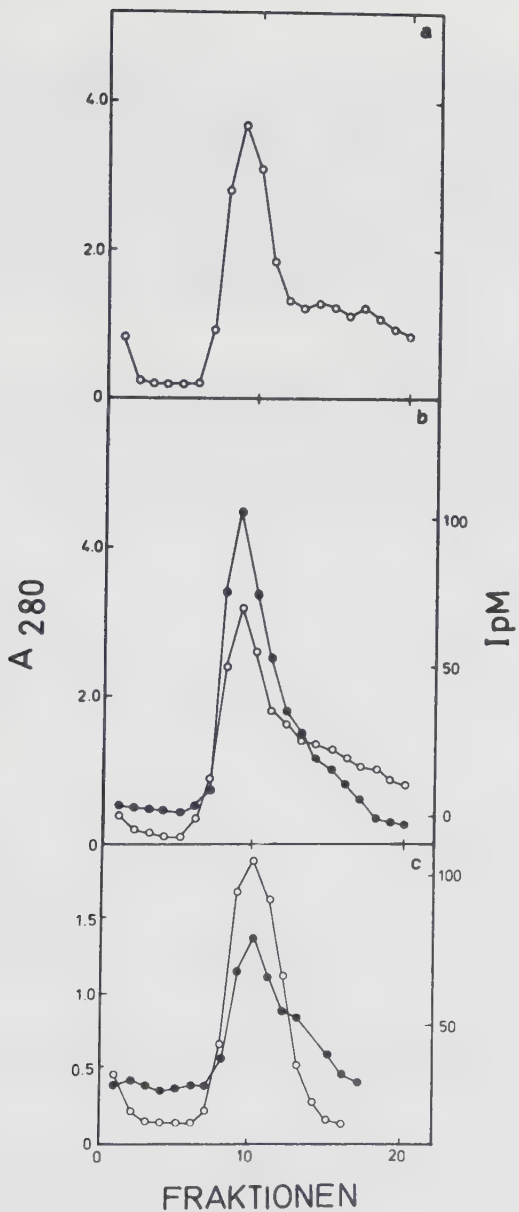


Fig. 4. Sephadex-G-25-Gelfiltration von Hefezellen-Rohextrakten
(Legende s. nächste Seite)

Fig. 4. Sephadex-G-25-Gelfiltration von Hefezellen-Rohextrakten

100 g Sephadex G-25 wurden über Nacht in 100 ml dest. Wasser gequollen. Nach Abdekantieren des Wassers wurde mit 0.001 M Na-Phosphat-Puffer pH 7.5 equilibriert und bis zu einer Füllhöhe von 15 cm in 20 x 1.5 cm Säulen gefüllt. 2 ml des jeweiligen Hefezellen-Rohextraktes wurden auf die Säulen aufgetragen und nach Einsickern der Proben mit 0.001 M Na-Phosphat-Puffer pH 7.5 nacheluiert. Mit einem Fraktions-sammler wurden Fraktionen zu je 25 Tropfen gesammelt und der Proteingehalt bei 280 nm am ZEISS-Spektrophotometer bestimmt.

o = Absorption bei 280 nm

● = Radioaktivität

- a) Charakteristisches Elutionsprofil eines unmarkierten Hefe-Rohextraktes
- b) Elutionsprofil einer Mischung von 1 mg gereinigter markierter fas 1-169-Fettsäuresynthetase (1 000 IpM) mit 2 ml Rohextrakts aus fas 2-308
- c) Elutionsprofil von gereinigtem ^{14}C -Pantothensäure-markiertem fas 1-169 Enzym (1 000 IpM)

^{14}C -Pantothenensäure-markierter Synthetase mit unmarkiertem Rohextrakt (Fig. 4c). Wenngleich damit auch noch nicht erwiesen war, daß es sich bei den beobachteten Linien tatsächlich um Fettsäuresynthetase-Untereinheiten handelte, erschien dies doch wahrscheinlich. U.a. zur Kontrolle der Richtigkeit dieser Annahme wurden daher mit dieser in Material und Methoden ausführlich beschriebenen Methode alle nun folgenden Experimente unternommen.

(b) SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Rohextrakten verschiedener fas-Mutanten

(i) Untersuchung von komplementierenden fas-Missens-Mutanten

Missens-Mutanten sind definitionsgemäß Basenaustausch-Mutationen, bei denen in dem durch die Mutation betroffenen Protein eine bestimmte Aminosäure durch eine andere ersetzt ist. Das Molekulargewicht des Proteins ändert sich dadurch jedoch praktisch nicht. Bei der SDS-Gelelektrophorese sollten sich diese fas-Mutanten-Proteine daher wie die aus Wildtyp-Zellen verhalten.

Die mit je 5 derartigen fas-Mutanten der Komplementationsgruppen II und V erhaltenen Ergebnisse (Tab. 1) können in Übereinstimmung mit einer solchen Annahme interpretiert werden. Alle Gelmuster enthalten zwei Protein-Banden an der für die Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B typischen Stelle. Fig. 5a zeigt ausgewählte und charakteristische Gelmuster dieser Mutanten.

(ii) Untersuchung des Rohextraktes nicht-komplementierender fas-Missens-Mutanten

Im Gegensatz zu den komplementierenden fas-Missens-Mutanten enthalten die nicht-komplementierenden keinen proteinchemisch Wildtyp-artigen und somit leicht isolierbaren Fettsäuresynthetase-Komplex mehr (11). Falls

Tab.1. Zusammenstellung der fas-Mutanten, deren Rohextrakte durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese untersucht wurden

Bzgl. Einzelheiten der exp. Durchführung vgl. Fig. 5

Ploidie	Genort	Allel-Nr.	Kompl.-Gruppe	Gelmuster
haploid	fas 1	58, 93, 291, 335, 368	II	wie fas 1-93 in Fig. 5a
		13, 42, 45, 89, 104, 130, 137, 143, 155, 167, 175, 193, 195, 227, 251, 267, 270, 315, 328, 410, 503, 505	III	wie fas 1-155 in Fig. 5a
		120, 171, 266, 283, 339	V	wie fas 1-120 in Fig. 5a
haploid	fas 2	28, 87, 79, 109, 119, 122, 125, 168, 229, 263, 296, 308, 342, 364, 382, 384, 394, 396, 509, 510	IV	wie fas 2-394 in Fig. 5a
diploid	fas 1	13, 13, 13, 89	III	wie
	fas 2	331, 28, 296, 278, 89, 155, 155, 155, 384, 78, 509, 325, 155, 270, 155, 195, 28, 79, 263, 384, 505, 505, 505, 78, 79, 384	IV	fas 1-505 in Fig. 5b fas 2-190

jedoch einzelne Untereinheiten des Komplexes in diesen Mutanten noch synthetisiert werden sollten, müßten sie mit der hier beschriebenen Versuchsanordnung nachweisbar sein.

10 Vertreter der fas 1-Komplementationsgruppe III (nicht-komplementierend), sowie 4 Vertreter der fas 2-Komplementationsgruppe IV (ebenfalls nicht-komplementierend) wurden untersucht (Tab. 1). Die erhaltenen Linien sind in Fig. 5a gezeigt. Im Vergleich zu dem mit komplementierenden Missens-Mutanten erhaltenen Muster sieht man, daß bei den komplementierenden Missens-Mutanten die untere der beiden erkennbaren Banden verstärkt, bei den nicht-komplementierenden Missens-Mutanten dagegen eher etwas geschwächt im Vergleich zur oberen (schweren) Bande vorliegt.

Weiterhin wurden Temperatur-sensitive nicht-komplementierende wie auch komplementierende Missens-Mutanten untersucht (21-ts, 29-ts, 31-ts, 32-ts, 42-ts, 55-ts, 57-ts, 60-ts, 77-ts, 28-ts). Die damit erhaltenen Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den für nicht-conditionale Mutanten geschilderten Ergebnisse (Fig. 5b). Dies war zu erwarten, da conditionale Mutanten fast ausnahmslos Missens-Mutanten darstellten. Es zeigte sich, daß komplementierende ts-Mutanten bei permissiver wie bei nicht-permissiver Temperatur die untere Bande im Vergleich zur oberen wesentlich verstärkt enthielten. Demgegenüber zeigten alle nicht-komplementierenden ts-Mutanten dieses Bild nur bei permissiver Temperatur, während sie sich bei nicht-permissiver Temperatur wie die nicht-komplementierenden, nicht-conditionalen Missens-Mutanten verhielten, d.h. zwei nahezu gleichstarke Banden aufwiesen (Fig. 5b).

Zur Kontrolle wurden die aus den verschiedenen ts-Mutanten erhaltenen Extrakte auch noch immunologisch mit einem spezifischem Fettsäuresynthetase-Antiserum untersucht. Dabei zeigte sich, daß die komplementierende ts-Mutante 28-ts nach Anzucht bei beiden Temperaturen, 22°C wie 37°C, Fettsäure-analoges CRM enthielten, daß hingegen bei nicht-komplementierenden ts-Mutanten nur nach Wachstum der Zellen bei permissiver Temperatur ein Fettsäuresynthetase-analoges CRM zu beobachten war (Fig. 6).

(iii) Untersuchung des Rohextraktes von fas-Nonsense-Mutanten

Je 15 Nonsense-Mutanten der fas 1-Komplementationsgruppe III und der entsprechenden fas 2-Komplementationsgruppe IV wurden untersucht (Tab. 1). Der Nonsense-Charakter der Mutationen war von TAURO et al. (51) und von SCHWEIZER (unveröffentlichte Versuche) durch Suppressor-Studien nachgewiesen worden. Die mit diesen Mutanten beobachteten Gelmuster (Fig. 5c) entsprechen denen der nicht-komplementierenden Missens-Mutanten in Fig. 5a, d.h. es traten auch in diesem Fall 2 nahezu gleichstarke Linien auf.

Dasselbe Ergebnis wurde schließlich auch beobachtet bei der Untersuchung von Extrakten, die aus haploiden fas 1/fas 2-Doppelmutanten gewonnen wurden, bei denen beide beteiligten fas-Allele von nicht-komplementierenden Nonsense-Mutanten stammten. In diesem Fall sollten eigentlich von beiden Fettsäuresynthetase-Untereinheiten nur noch Fragmente synthetisiert werden. Da jedoch alle untersuchten Doppelmutanten (Tab. 1) dasselbe Gelmuster wie die nicht-komplementierenden haploiden Elternstämme aufwiesen, erschien es unwahrscheinlich, daß es sich bei den beiden im Gel beobachteten Banden nur um Fettsäuresynthetase-Untereinheiten handelt. Die Ergebnisse machen vielmehr wahrscheinlich, daß der Rohextrakt aus Hefe noch andere Proteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von 180 000 - 200 000 enthält.

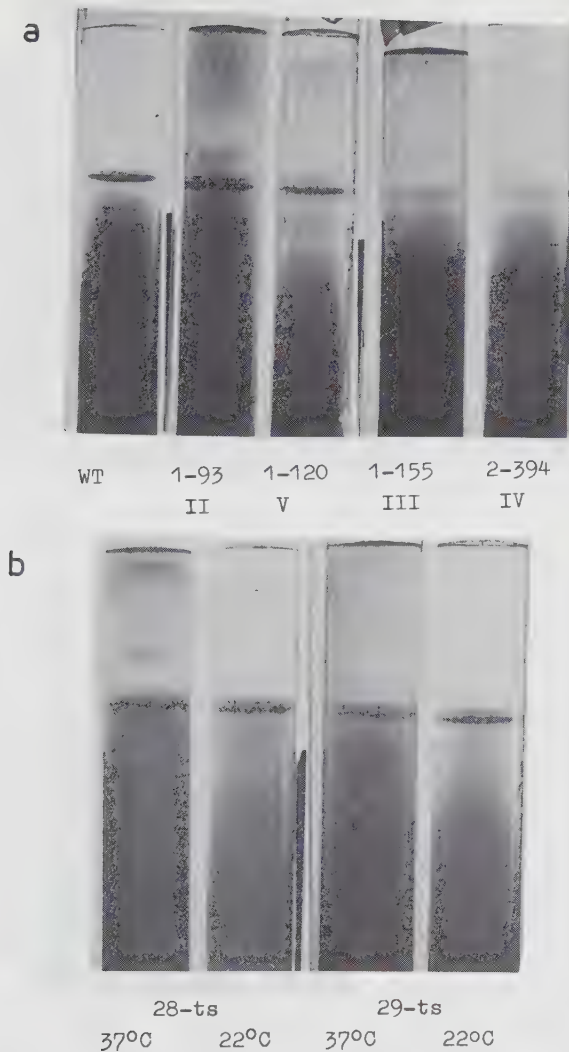
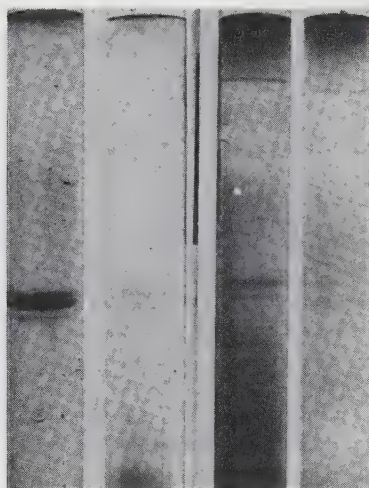


Fig. 5. SDS-Gelelektrophorese von Rohextrakten nach Gel-filtration über Sephadex G-25

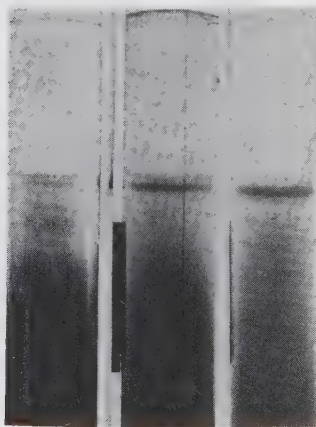
Aufschluß der Hefezellen wie in Material und Methoden, anschließende Sephadex G-25-Filtration wie in Fig. 4 beschrieben. 0.3 ml der jeweiligen Spitzenfraktionen wurden mit 0.15 ml SDS (10%) und 1 Tropfen Mercaptoäthanol versetzt und 3 h bei 37°C inkubiert. Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wie in Material und Methoden beschrieben. Fortsetzung s. nächste Seite.

c



WT 2-109 2-190 2-109
rein IV 1-505 1-155

d



1-42 1-42 1-42
 + WT + 2 x WT

Fig. 5. SDS-Gelelektrophorese von Rohextrakten nach Gel-
filtration über Sephadex G-25

(Fortsetzung)

- (a) Bandenmuster nicht-conditionaler fas-Mutanten
- (b) Bandenmuster von fas-ts-Mutanten
- (c) Bandenmuster von fas-Doppelmutanten
- (d) Bandenmuster der Mischung einer nicht-komplemen-
tierenden fas-Mutante mit Wildtyp-Extrakt

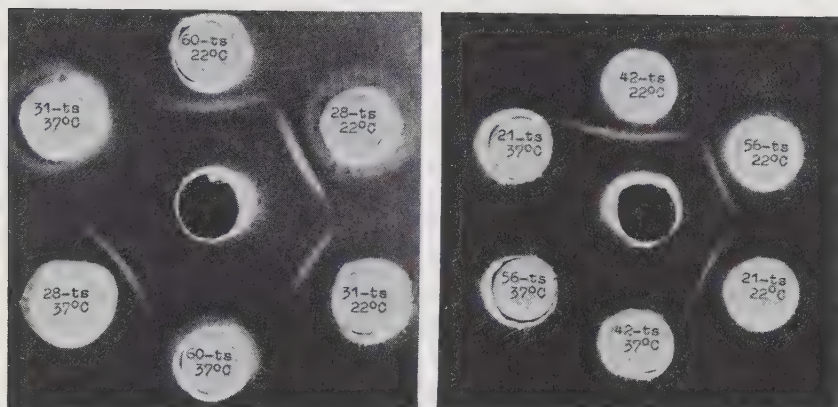


Fig. 6. Immendiffusion mit Rohextrakten von ts-Mutanten nach Wachstum bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur

Die Immun-Doppeldiffusions-Analyse wurde nach OUCHTERLONY wie folgt ausgeführt (52-54): 0.175 g Agarose wurden durch Erhitzen in 25 ml 0.85 %iger Kochsalzlösung gelöst. Die heiße Lösung wurde auf fettfreie Objektträger (76 x 26 mm) aufgetragen (2.5 ml/Objektträger), gleichmäßig darauf ausgestrichen und zum Erstarren 30 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurde das jeweilige Gelmuster mit einer speziellen Kanüle eingestanzt und mit Hilfe einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene PASTEUR-Pipette abgesaugt. In das mittlere Loch wurden stets 8 μ l Fettsäuresynthetase-Antiserum aus Kaninchen (55) gegeben. Die äußeren Löcher enthielten zwischen 6 und 20 μ l der jeweiligen Antigenlösung. Nach 1-2 Tagen Inkubation bei 40°C konnten die Immunpräzipitations-Muster ausgewertet werden.

Diese Annahme konnte zusätzlich bestätigt werden durch ein Experiment, in dem gereinigte Fettsäuresynthetase einem Zellrohextrakt vor der SDS-Gelelektrophorese zugemischt wurde. Wie Fig. 5d zeigt, werden dabei nicht beide Banden gleichmäßig, sondern nur die untere deutlich sichtbar verstärkt. Dieses Ergebnis scheint darauf hinzuweisen, daß die untere Bande beide Fettsäuresynthetase-Untereinheiten enthält, während die obere Bande möglicherweise von einem anderen im Zellrohextrakt befindlichen Protein herrührt. Allerdings könnte auch ein SDS-resistenter spezifischer Abbau der Fettsäuresynthetase-Untereinheit A im Gemisch stattfinden. Die Labilität von A ist bekannt, wobei bevorzugt ein Protein der ungefähren Größe B entsteht (10).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in diesem Abschnitt geschilderten Ergebnisse keine eindeutige Antwort auf die anfangs gestellte Frage lieferten, da einerseits die Fettsäuresynthetase-Banden mit anderen im Rohextrakt befindlichen Proteinen zusammenfielen und zum anderen die Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B durch SDS-Gelelektrophorese von Rohextrakten nicht oder kaum getrennt werden können. Daher kann weder das Fehlen der einen oder der anderen Untereinheit noch die Abwesenheit beider Untereinheiten im Rohextrakt erkannt werden. Daher wurde mit den im folgenden beschriebenen Versuchen nach einer anderen Möglichkeit zur Lösung dieses Problems gesucht.

2. Einbau von ^{14}C -Pantothensäure in den Fettsäuresynthetase-Komplex von fas 1-Nonsens-Mutanten

4'-Pantothensäure ist als charakteristische prosthetische Gruppe des Fettsäuresynthetase-Systems aller bisher untersuchten Organismen kovalent an das Enzymprotein gebunden (56). Versuche von SCHWEIZER et al. (57) mit ^{14}C -markierter Pantothensäure haben gezeigt, daß in der Fettsäuresynthetase der

Hefe die Pantothensäure an die Untereinheit A, d.h. das Produkt des Genortes fas 2, gebunden ist. Weiterhin existiert bisher kein Hinweis dafür, daß Pantothensäure in Hefe noch an irgendein anderes Protein gebunden wird. Damit schien es möglich, an Hand des Einbaus von ^{14}C -Pantothensäure in die Proteinfraction der Hefe zu unterscheiden, ob fas 2-Genprodukt synthetisiert wird oder nicht.

Diese Frage zu untersuchen erschien besonders interessant in einer fas 1-Nonsense-Mutante, in der kein intaktes fas 1-Genprodukt mehr synthetisiert werden konnte. Man könnte sich dabei von der stattfindenden bzw. ausbleibenden Synthese von ^{14}C -Pantothensäure-markiertem fas 2-Genprodukt Aufschluß darüber erwarten, ob der Ausdruck von fas 1 und fas 2 koordiniert ist oder nicht.

Der Einbau von ^{14}C -Pantothensäure in die Fettsäuresynthetase-Untereinheit A sollte mit zwei verschiedenen Methoden untersucht werden, einmal durch Untersuchung des Einbaus von ^{14}C -Pantothensäure in die gesamte lösliche Proteinfraction der Zellen und zum anderen durch SDS-Gelelektrophorese des Rohextraktes von ^{14}C -Pantothensäure-markierter Hefezellen und anschließende Untersuchung der Radioaktivität der beiden hierbei zu beobachtenden Fettsäuresynthetase-haltigen Proteinbanden (vgl. vorhergehenden Abschnitt, Fig. 5a).

Der Einbau von ^{14}C -Pantothensäure in die Gesamtheit aller löslicher Proteine in Hefe wurde nach Anzucht der Zellen in markiertem Medium, Aufschluß wie üblich und anschließender Gelfiltration des Zellextraktes an Sephadex G-25 bestimmt. In einer Serie von Vorversuchen wurde zunächst gezeigt, daß sich freie und Protein-, d.h. Fettsäuresynthetase-gebundene Pantothensäure mit dieser Methode leicht voneinander trennen und damit unterscheiden lassen (Fig. 7a-c). Weiterhin ergab sich, etwa durch Verwendung von ^{14}C -Pantothensäure-gewachsenen Wildtyp-Zellen, daß sich der Einbau von Pantothensäure in den Fettsäuresynthetase-Komplex ebenfalls eindeutig zu erkennen gibt (Fig. 8a). Wurde ein entsprechender Versuch jedoch

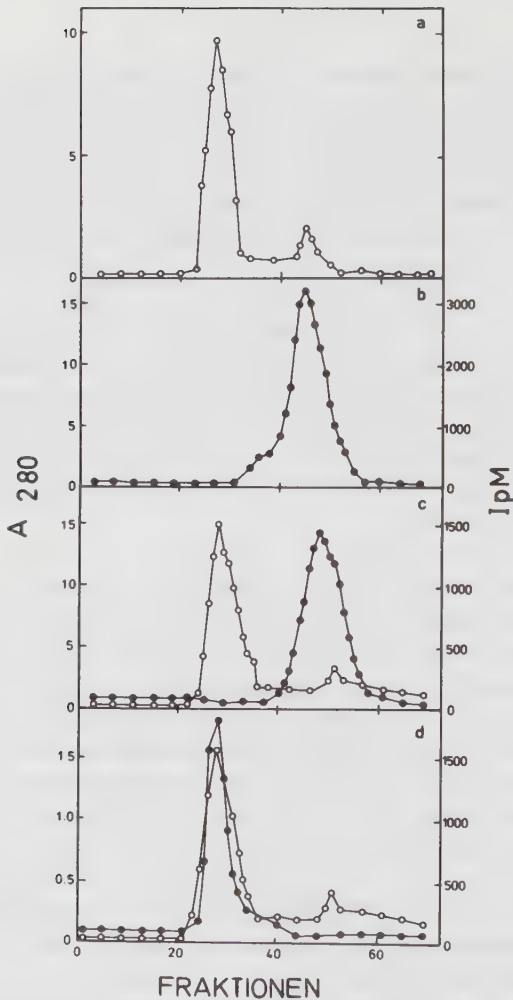


Fig. 7. Trennung von Fettsäuresynthetase-gebundener und freier ^{14}C -Pantoithensäure durch Gelfiltration an Sephadex G-25

Zur experimentellen Durchführung vgl. Fig. 4.

- = Absorption bei 280 nm
- = Radioaktivität

- a) Wildtyp-Rohextrakt (Aufschluß von 2 g Zellen mit 1 ml Kaliumphosphat-Puffer, enthaltend 2% SDS und 0.1% Mercapto-äthanol)
- b) ^{14}C -Pantoithensäure (15 000 IpM)
- c) Gemisch von ^{14}C -Pantoithensäure (10 000 IpM) und Wildtyp-Rohextrakt wie in a)
- d) Gemisch von Wildtyp-Rohextrakt wie in a) und gereinigtem ^{14}C -Pantoithensäure-markiertem fas 1-169 Enzym

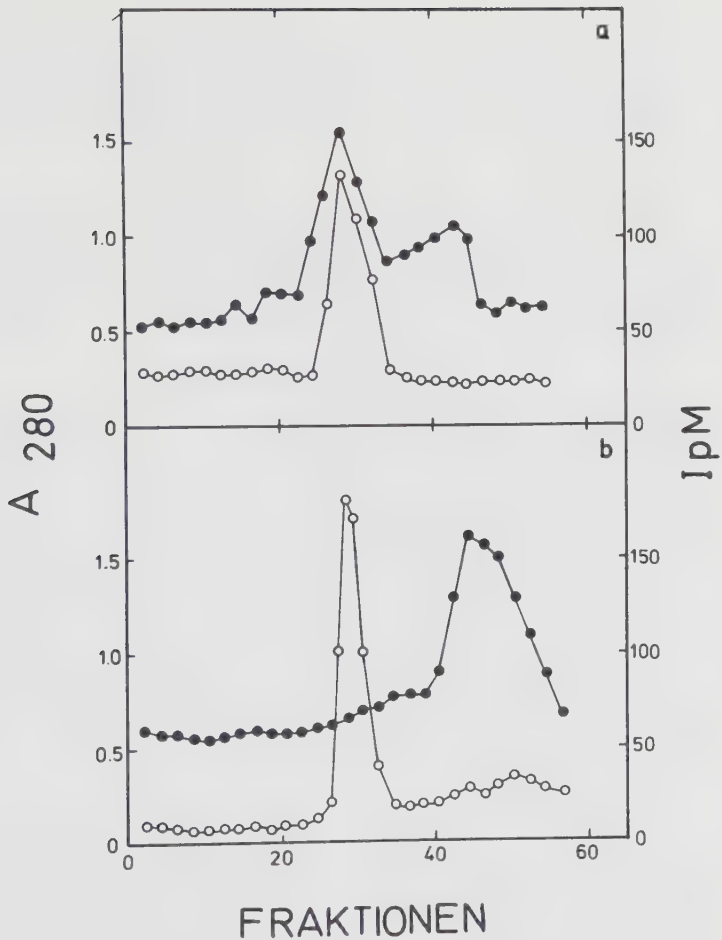


Fig. 8. Gelfiltration des Zellextraktes von ^{14}C -Pantothensäuregewachsenen Wildtyp-Zellen (a) und fas 1-267-Zellen (b) an Sephadex G-25

Es wurden 5 g Wildtyp-Zellen bzw. 3 g fas 1-267-Zellen in jeweils 2 ml 0.001 M Na-Phosphat-Puffer pH 7.5 enthaltend 2% SDS, 0.1% Mercaptoäthanol aufgeschlossen und der von Zelltrümmern befreite Rohextrakt, wie in Fig. 4 beschrieben, über Sephadex G-25 filtriert.

o = Absorption bei 280 nm
● = Radioaktivität

mit einer fas 1-Nonsense-Mutante durchgeführt, so konnte kein Einbau von ^{14}C -Pantothersäure in die Proteinfraction der Zellen beobachtet werden, obwohl die fas 2-Region dieser Mutante genetisch intakt war (Fig. 8b).

Dieses Ergebnis spricht entweder für ein mit dem Fehlen der Untereinheit B einhergehendes Fehlen der Untereinheit A in fas 1-Nonsense-Mutanten, oder aber dafür, daß Pantothersäure nur in den intakten Fettsäuresynthetase-Komplex integriert werden kann.

Zu einem entsprechenden Ergebnis führten die Versuche, in denen der ^{14}C -Pantothersäure-Einbau in die Fettsäuresynthetase-Untereinheit A durch SDS-Gelelektrophorese des gesamten Zellextraktes bestimmt wurde. Auch hier zeigte sich, daß zwar mit Extrakten aus Wildtyp-Zellen, nicht aber mit einem solchen aus einer fas 1-Nonsense-Mutante eine radioaktive Markierung an der für die Fettsäuresynthetase-Untereinheiten charakteristischen Stelle im Gel beobachtet wurde (Fig. 9a, c). Ein spezifischer Abbau von Fettsäuresynthetase erscheint unwahrscheinlich, da eine dem Mutantenextrakt zugemischte ^{14}C -Pantothersäure-markierte Fettsäuresynthetase in einem Kontrollversuch noch deutlich nachgewiesen werden konnte (Fig. 9b).

Die Ergebnisse der geschilderten beiden Versuchsreihen lassen weiterhin die eingangs gestellte Frage offen, ob fas 1- und fas 2-Genausdruck in Hefe miteinander gekoppelt sind. Alle erhaltenen Befunde lassen sich auch mit einer noch fehlenden Nachweisbarkeit der freien Fettsäuresynthetase-Untereinheiten im Zellextrakt erklären. Es wurden daher weitere Versuche unternommen, diese Frage zu klären.

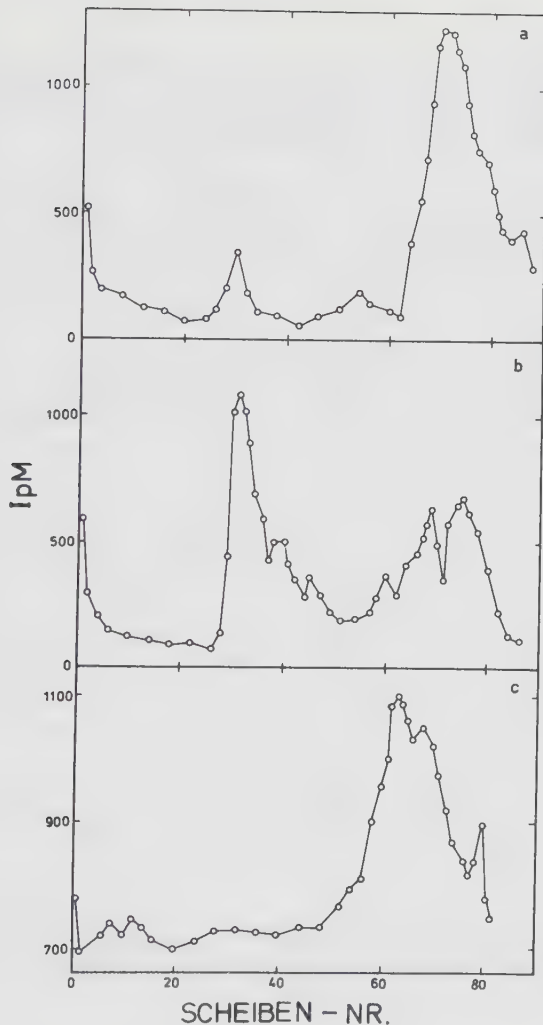


Fig. 9. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Wildtyp (a) und fas 1-267 (c) Rohextrakt nach Anzucht in ^{14}C -Pantothensäure-markiertem Medium

Zur experimentellen Durchführung vgl. Material und Methoden. Pro Gel wurden 1.5 ml Sephadex G-25 filtrierter Zell-extrakt (10 000 IpM) verwendet. Im Versuch (b) wurde ^{14}C -Pantothensäure-markierter Wildtyp-Rohextrakt (10 000 IpM) und ^{14}C -Pantothensäure-markiertes fas 1-169 Enzym (14 000 IpM) vor der Elektrophorese miteinander gemischt.

3. Untersuchung der Synthese von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten in nicht-komplementierenden fas-Mutanten durch Markierung mit radioaktiven Aminosäuren

Angenommen, in einigen der in den vorangegangenen Abschnitten untersuchten fas-Mutanten war zwar kein intakter Komplex enthalten, jedoch lagen noch einzelne Fettsäuresynthetase-Untereinheiten vor, so konnte mit den bisher angewandten Methoden dies nicht nachgewiesen werden. Mit den im folgenden beschriebenen Experiment sollte dagegen ein solcher Nachweis möglich sein. Hierbei sollte versucht werden, die in nicht-komplementierenden fas-Mutanten evtl. vorhandenen freien Fettsäuresynthetase-Untereinheiten unter geeigneten Bedingungen wieder in einen intakten Multienzymkomplex einzubauen. Beispielsweise sollten Untereinheiten, die in nicht-komplementierenden ts-Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur zwar synthetisiert, aber nicht in den Komplex integriert werden, nachträglich in den Multienzymkomplex eingebaut werden können, wenn die Zellen in permissive Wachstumsbedingungen (22°C) überführt werden. Ebenso sollten Fettsäuresynthetase-Untereinheiten, die in nicht-conditionalen, nicht-komplementierenden fas-Mutanten evtl. noch vorhanden sind, nach Paarung dieser Zellen mit einem Wildtyp-Stamm oder mit einer anderen, komplementierenden fas-Mutante in den nach der Paarung in der diploiden Zelle gebildeten Fettsäuresynthetase-Komplex eingebaut werden.

(a) Untersuchung der Synthese von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten in fas-ts-Mutanten bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur

Fig. 10 zeigt, wie bei nicht-permissiver Temperatur nur von einer komplementierenden fas 1-Mutante (38-ts), jedoch nicht bei einer nicht-komplementierenden fas 1- (31-ts)- oder fas 2- (60-ts) Mutante Fettsäuresynthetase-Protein synthetisiert wird, das sich unter den darauffolgenden permissiven Bedingungen in dem Fettsäuresynthetase-Komplex einbauen läßt.

Nach Wachstum in mit ^{14}C -Aminosäure-Gemisch markiertem Medium zeigte die komplementierende Mutante eine Wildtyp-ähnliche, jedoch keine der nicht-komplementierenden ts-Mutanten eine nennenswerte Synthese von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten bei 36°C (Fig. 10a-d). Diese Ergebnisse sprechen sehr stark dafür, daß in nicht-komplementierenden fas-Mutanten auch die Fettsäuresynthetase-Untereinheiten des genetisch intakten fas-Genlocus nicht mehr synthetisiert werden.

(b) Untersuchung der Synthese von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten in nicht-conditionalen nicht-komplementierenden fas-Mutanten

Die Synthese von Fettsäuresynthetase in nicht-komplementierenden, nicht-conditionalen fas-Mutanten wurde wie folgt untersucht: Haploide komplementierende wie nicht-komplementierende fas 1- und fas 2-Mutanten wurden zunächst in einem mit ^{14}C -Aminosäuregemisch markierten Medium angezüchtet, dann in nicht-markiertem Medium mit einer entsprechenden fas 2- bzw. fas 1-Mutante des entgegengesetzten Paarungstyps gekreuzt und die Diploiden dann noch für 2 Generationen wachsen gelassen.

Es zeigte sich, daß die so gewachsenen diploiden Zellen nur dann radioaktiv-markierte Fettsäuresynthetase-Untereinheiten enthielten, wenn der zuvor im radioaktiven Medium gezüchtete Kreuzungspartner entweder eine komplementierende fas-Mutante oder ein Wildtyp-Stamm war. Lag jedoch eine nicht-komplementierende fas-Mutante vor, konnten keine radioaktiv markierten Fettsäuresynthetase-Untereinheiten mehr beobachtet werden (Fig. 11a-d). Bei einigen speziellen nicht-komplementierenden fas-Missens-Mutanten wurde allerdings ein zwar gegenüber den komplementierenden fas-Mutanten stark reduzierter jedoch noch deutlich erkennbarer Einbau radioaktiver Aminosäuren festgestellt. Diese Mutanten waren solche, die nach in dieser Arbeit weiter hinten beschriebenen Befunden (vgl. S. 55) noch Fettsäuresynthetase-analoges immunologisch kreuzreagierendes Material enthalten. Dieses Material weist jedoch vom

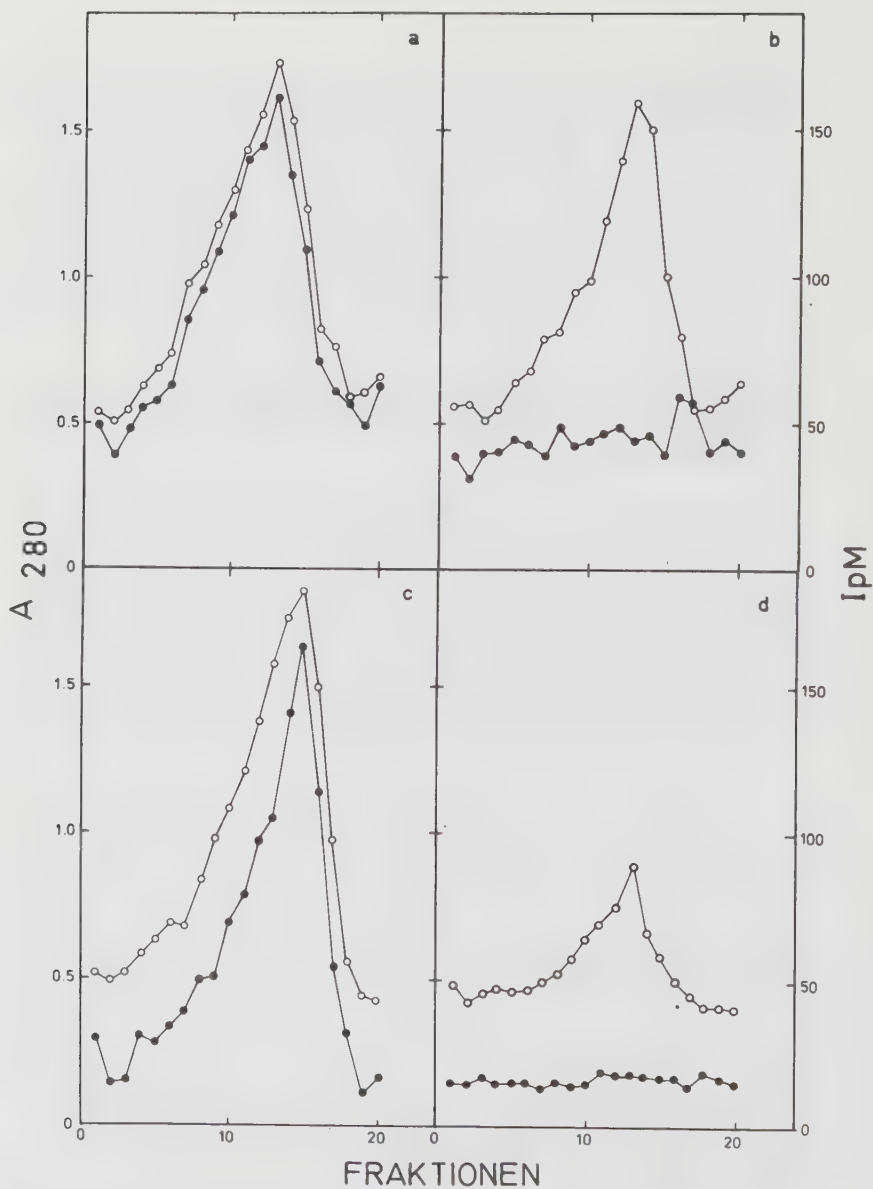


Fig. 10. Einbau ^{14}C -markierter Aminosäure in Fettsäuresynthetase-Protein komplementierender und nicht-komplementierender temperatur-sensitiver fas-Mutanten

(Legende s. Seite 52)

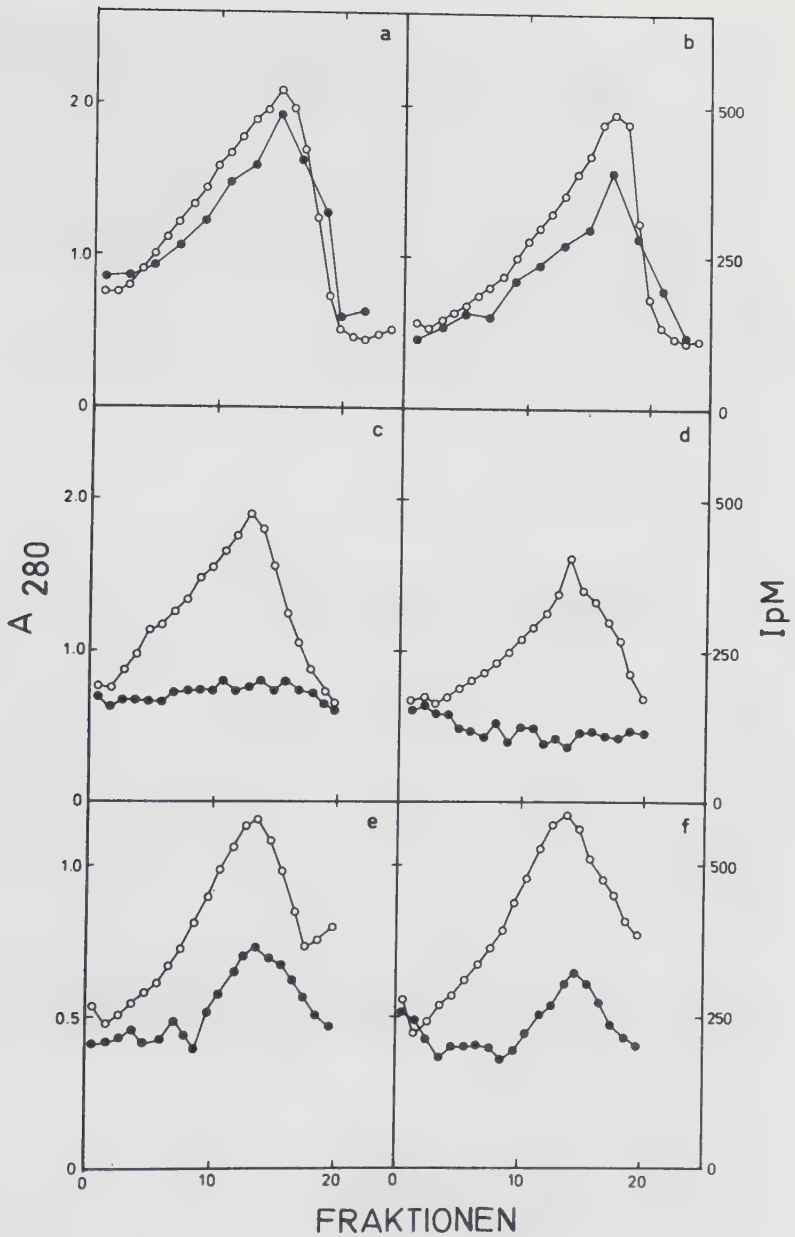


Fig. 11. Einbau ^{14}C -markierter Aminosäuren in Fettsäuresynthetase-Protein komplementierender und nicht-komplementierender fas-Mutanten

(Legende s.nächste Seite)

Fig. 10. Einbau ^{14}C -markierter Aminosäuren in Fettsäuresynthetase-Protein komplementierender und nicht-komplementierender temperatur-sensitiver fas-Mutanten

Ein haploider Wildtyp-Stamm (a), die nicht-komplementierenden Mutanten 31-ts (b) und 60-ts (d), sowie die komplementierende Mutante 38-ts (c) wurden jeweils in 3 l des in Material und Methoden näher beschriebenen Mediums bei 36°C für 2 Tage angezüchtet. Dann wurden die bei 22°C steril abzentrifugierten Zellen zweimal mit je 200 ml dest. Wasser gewaschen und anschließend sofort in unmarkiertem YEP-Medium resuspendiert und bei 22°C weiter inkubiert. Nach 2-3 Generationen (Wachstumskontrolle durch Trübungsmessung bei 578 nm) wurden die Zellen geerntet und aus ihnen der Fettsäuresynthetase-Komplex isoliert und nach Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation die in ihm gebundene Radioaktivität bestimmt.

- o = Absorption bei 280 nm
- = Radioaktivität

Fig. 11. Einbau ^{14}C -markierter Aminosäuren in Fettsäuresynthetase-Protein bei komplementierenden und nicht-komplementierenden fas-Mutanten

Nicht-conditionale fas-Mutanten wurden durch Anzucht der Zellen in jeweils 2 l ^{14}C -markiertem MIN-Medium bei 30°C markiert. In Parallel-Ansätzen wurden haploide fas 1 und fas 2 Mutanten des entgegengesetzten Paarungstyps in je 2 l unmarkiertem YEP-FS-Medium angezüchtet. In der frühen stationären Phase wurden beide Arten von Kulturen steril geerntet und zweimal mit je 200 ml sterilem dest. Wasser gewaschen. Dann wurden markierte und unmarkierte Zellen vom entgegengesetzten Paarungstyp in 200 ml YEP-Medium gemischt, zu einem dicht gepacktem Niederschlag abzentrifugiert und dieses über Nacht bei 30°C zur Paarung der Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen in 16 l YEP-Medium suspendiert und die gebildeten diploiden Zellen für weitere 2-3 Generationen weitergezüchtet.

Die Sterne bezeichnen die haploiden Mutanten, die vor der Paarung in radioaktivem Medium angezüchtet wurden. Enzymreinigung und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation sind in Material und Methoden beschrieben. Römische Zahlen geben die jeweilige Komplementationstrategie an.

- o = Absorption bei 280 nm
- = Radioaktivität

- a) fas 2-105* / fas 1-201 (VI/V)
- b) fas 1-201* / fas 2-394 (V/VI)
- c) fas 1-42* / fas 2-394 (III/IV)
- d) fas 2-394* / fas 1-42 (IV/III)
- e) fas 1-270* / fas 2-28 (III/IV)
- f) fas 1-155* / fas 2-394 (III/IV)

Wildtyp-Enzym abweichende proteinchemische Eigenschaften auf, etwa der Art, daß es sich nicht mehr mit der für den Wildtyp-Komplex gültigen Anreicherungsmethode reinigen läßt (vgl. S. 79).

(c) Untersuchung des Einbaues radioaktiver Aminosäuren in die getrennten Fettsäuresynthetase-Untereinheiten

Wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, wird in gewissen nicht-komplementierenden fas-Mutanten noch immunologisch kreuzreagierendes, aber proteinchemisch deutlich vom Wildtyp-Enzym verschiedenes Fettsäuresynthetase-Protein synthetisiert. In der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Versuchsanordnung wurde dieses Mutanten-Protein offenbar in dem aus den diploiden Zellen isolierten Komplex fixiert und somit einer Untersuchung zugänglich gemacht. Diese erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der aus den Diploiden isolierten Enzyme (Fig. 11e und f) und anschließende Bestimmung der radioaktiven Markierung der getrennten Fettsäuresynthetase-Banden A und B (Fig. 12 A). Wie aus Fig. 12 B hervorgeht, unterscheidet sich diese Markierung qualitativ wie quantitativ nicht von der des Wildtyp-Enzyms. Es muß daher angenommen werden, daß die in den Mutanten fas 1-155 und fas 1-270 beobachteten proteinchemischen Veränderungen des Fettsäuresynthetase-Komplexes entweder erst durch nachträgliche Modifizierung des Mutanten-Komplexes entstehen oder aber daß in diesen Mutanten die Fettsäuresynthetase-Untereinheiten zwar gleich groß wie in Wildtyp-Zellen sind, daß aber der Komplex kein hexameres, sondern ein niedrigeres Aggregat ist.

4. Immunologische Charakterisierung komplementierender und nicht-komplementierender fas-Mutanten

Die bisher beschriebenen Versuche haben ergeben, daß in nicht-komplementierenden fas 1- und fas 2-Mutanten die Synthese von Fettsäuresynthetase-Komponenten proteinchemisch nicht nachgewiesen werden kann. Dies mag darauf beruhen, daß eine solche Synthese nicht stattfindet, oder aber darauf, daß es

A



B

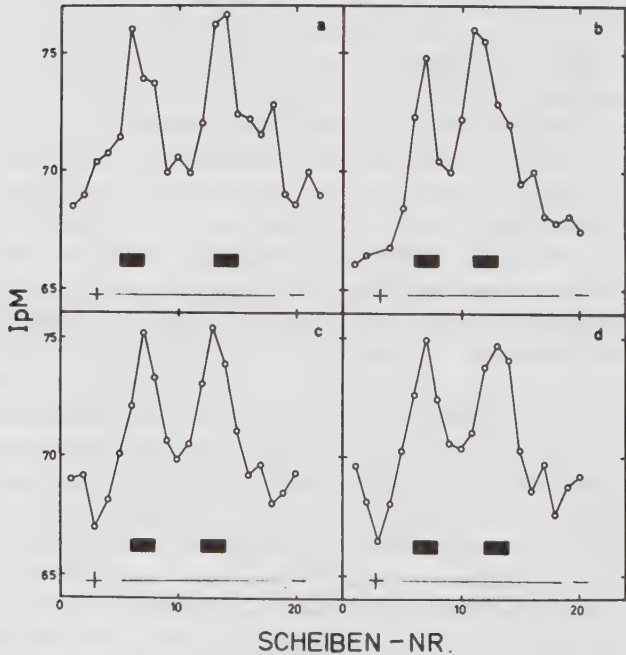


Fig. 12. Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in einzelne Fettsäure-synthetase-Untereinheiten unter den in Fig. 10 und 11 beschriebenen Bedingungen

A. 0.2 ml (a und b) bzw. 0.8 ml (c und d) der Spitzenfraktionen der in Fig. 10 und 11 gezeigten Saccharose-Dichtegradienten wurden auf die ganze Länge eines SDS-Polyacrylamid-Flachgels aufgetragen und einer 48 stündigen Elektrophorese bei 20°C unterworfen. Weitere Einzelheiten vgl. Material und Methoden

B. Radioaktivitätsverteilung im zerschnittenen Gel
a) Wildtyp, b) 38-ts, c) fas 1-155*, d) fas 1-270*

(*) Lage der Proteinbanden im SDS-Gel nach Anfärben mit Coomassie-Blau)

mit den bisher bekannten Methoden nicht gelingt, die mutierten Proteine - seien sie in ihrer Primär-, Tertiär- oder Quartärstruktur gegenüber dem Wildtyp-Enzym verändert - zu erfassen. Es sollte daher im folgenden versucht werden, mit der sehr empfindlichen Methode des immunologischen Nachweises die Existenz von Fettsäuresynthetase-Protein in nicht-komplementierenden fas-Mutanten zu untersuchen. Solche Untersuchungen können schon mit rohem Zellextrakt durchgeführt werden (55).

(a) Immun-Doppeldiffusions-Analyse von Zellextrakten komplementierender und nicht-komplementierender fas-Mutanten mit spezifischem Fettsäuresynthetase-Antiserum

Frühere Untersuchungen hatten ergeben, daß komplementierende fas-Mutanten generell immunologisch CRM-positiv sind, während nicht-komplementierende ebenso generell CRM-negativ sind ((55), Fig. 13a). In Erweiterung dieser Versuche führte die in dieser Arbeit durchgeführte immunologische Charakterisierung einer wesentlich größeren Zahl conditionaler wie nicht-conditionaler genetisch nicht-komplementierender fas-Mutanten (51) zu den in Tab 2 und 3 aufgeführten Ergebnissen. Demnach war zwar auch in dieser Versuchsreihe die Mehrzahl aller untersuchten nicht-komplementierenden fas-Mutanten CRM-negativ. Jedoch war bei allen genetisch pleiotropen Komplementationsgruppen auch eine zwar geringe, aber experimentell gesicherte Zahl von CRM-positiven Mutanten zu beobachten. Im Fall der conditionalen Mutanten wurde deutlich, daß der CRM-negative Charakter nicht durch einen sehr geringen Proteingehalt des betreffenden Zell-Rohextraktes bedingt sein kann, da andere Mutanten mit ähnlich geringem Proteingehalt CRM-positiv waren, sobald sie bei permissiver Temperatur gewachsen waren (vgl. z.B. 136-ts in Tab. 3).

Gleichzeitig wurde im Verlauf dieser Untersuchungen beobachtet, daß die bei CRM-positiven, nicht-komplementierenden fas-Mutanten beobachteten Immunlinien sich gewöhnlich in charakteristischer Weise von denen des Wildtyp-Enzyms unterschei-

Tab. 2 Immunologische Untersuchung von Rohextrakten nicht-komplementierender fas-Mutanten

Anzucht und Aufschluß der Hefezellen erfolgten wie in Material und Methoden beschrieben. Die Immundiffusions-Analyse wurde wie in Fig. 6 beschrieben durchgeführt.

Genort	Allel-Nr.	Komplementations- gruppe	Immun- reaktion
fas 1	42, 106, 245, 261, 289, 337, 356, 795, 803, 805, 806, 811, 817, 818, 829, 832, 842, 845, 846, 853, 854, 865, 866, 867, 869, 877, 880, 881, 885, 889, 892, 897, 899, 900, 907, 911, 921	III	negativ
	799, 809, 815, 871, 873, 882, 884, 894, 895, 901		positiv
fas 2	109, 182, 219, 296, 340, 602, 607, 618, 625, 628, 634, 640, 648, 649, 651, 660, 662, 668, 670, 672, 673, 675, 680, 681, 682, 689, 691, 705, 713, 719, 728, 730, 733, 736, 739, 740, 742, 743, 747, 748, 755, 757, 759, 764, 771, 772, 773, 777	IV	negativ
	600, 624, 674, 702, 766, 788		positiv
	84, 294, 601, 606, 615, 639, 642, 646, 709, 722, 727, 756, 768	IX	negativ
	209, 653		positiv

Tab. 3 Immendiffusionsanalyse von Rohextrakten nicht-komplementierender temperatur-sensitiver Mutanten nach Anzucht bei permissiver bzw. nicht-permissiver Temperatur

Anzucht und Aufschluß der Hefezellen erfolgten wie in Material und Methoden beschrieben. Die Immendiffusions-Analyse wurde wie in Fig. 6 beschrieben durchgeführt.

Mutanten-Nr.	Proteingehalt		Immunpräcipitat- Bildung		
	Wachstums- temperatur:	22°	37°	22°	37°
		mg/ml			
82-ts		4.3	12.8	+	-
84-ts		5.1	5.1	+	+
88-ts		8.5	1.7	+	-
91-ts		8.5	4.6	+	-
92-ts		3.4	3.4	-	-
95-ts		2.1	5.9	-	-
97-ts		4.3	1.7	+	-
98-ts		16.1	3.4	+	-
101-ts		4.2	9.8	+	-
104-ts		17.0	3.4	+	+
105-ts		22.0	19.6	+	-
106-ts		25.4	8.1	+	-
107-ts		11.7	7.6	+	-
115-ts		25.8	0.9	+	-
124-ts		14.3	6.2	+	-
130-ts		4.2	13.6	+	-
132-ts		21.0	17.0	+	-
133-ts		26.4	12.1	+	-
134-ts		10.4	14.5	-	-
136-ts		3.4	9.4	+	-
139-ts		21.2	0.8	+	-
140-ts		8.5	0.9	+	-
143-ts		14.0	22.1	+	-
146-ts		23.7	19.5	+	-
147-ts		5.5	12.8	+	-
151-ts		12.7	5.6	-	-
152-ts		21.8	20.0	+	-
152-ts					

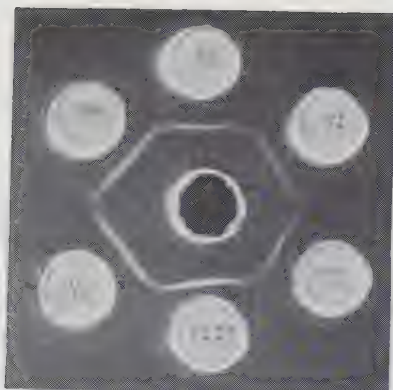
den. Während Wildtyp-Synthetase und das in komplementierenden fas-Mutanten synthetisierte Enzym einander gegenseitig völlig löschende und somit miteinander fusionierende Immunlinie bilden (Fig. 13a), beobachtete man zwischen Wildtyp-Enzym und dem in nicht-komplementierenden fas-Mutanten synthetisierte CRM nicht nur eine Spornbildung, sondern auch deutlich eine andere Position der Präzipitationslinie in der Agaroseschicht (fas 1-155 und fas 1-270 in Fig. 13b). Beides, Spornbildung und Positionsänderung, läßt sich auch noch in Extrakten aus hetero-allel-diploiden Zellen beobachten, die ein Wildtyp-Allel und ein derartiges CRM-positives nicht-komplementierendes fas-Allel enthalten (Fig. 13b). Daraus läßt sich schließen, daß der in diesen Mutanten synthetisierte mutierte Enzymkomplex oder die in ihnen enthaltenen Teile des Komplexes nur noch einen Teil der immunologischen Determinanten des Wildtyp-Komplexes enthalten (Spornbildung!).

Bei der vergleichenden Immunelektrophorese von Wildtyp-CRM und dem in manchen nicht-komplementierenden fas-Mutanten vorhandenen CRM zeigte sich, daß erwartungsgemäß Wildtyp-CRM und das CRM komplementierender fas-Mutanten eine identische Wanderungsgeschwindigkeit aufwiesen (Fig. 14a), während das in nicht-komplementierenden fas-Mutanten enthaltene CRM wesentlich langsamer wandert (Fig. 14b).

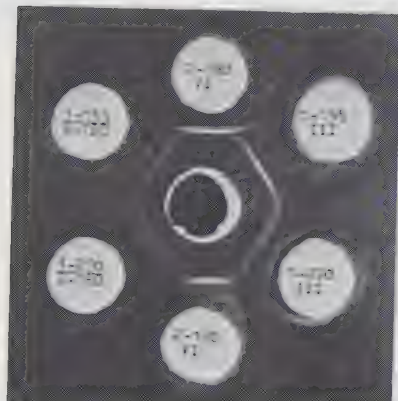
Im Gegensatz zu den im Vergleich mit Wildtyp-CRM beobachteten Unterschieden scheinen die immunologischen Determinanten der CRM-positiven nicht-komplementierenden fas-Mutanten sehr ähnlich zu sein, unabhängig davon, ob es sich um fas 1 oder fas 2-Mutanten handelt. Wie aus Fig. 13b und c. hervorgeht, weist das CRM dieser Mutanten untereinander keinerlei weitere Spornbildung auf und präzipitiert auch an vergleichbaren Stellen im Agarose-Gel.

Zur Kontrolle des CRM-negativen Charakters vieler fas-Mutanten diente eine Verdünnungsreihe mit Rohextrakt aus Wildtyp-Zellen. Hierbei zeigte sich, daß ein solcher CRM-positiver Extrakt bis zu 25 facher Verdünnung noch CRM-positiv bleibt

a



b



c

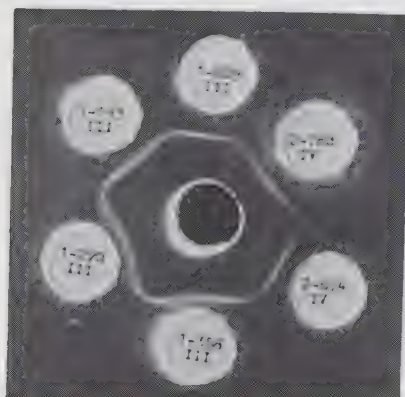


Fig 13. Immunologischer Vergleich CRM-positiver, nicht-komplementierender Missens-Mutanten

(Legende s.nächste Seite)

Fig. 13. Immunologischer Vergleich CRM-positiver, nicht-komplementierender Missens-Mutanten

Zur experimentellen Durchführung der Immun-Doppeldiffusions-Analyse vgl. Fig. 6. Römische Zahlen geben die Komplementationsgruppe, arabische Zahlen den fas-Locus bzw. die Allel-Nummern an.

- a) Rohextrakte von komplementierenden und nicht-komplementierenden fas-Mutanten
- b) Rohextrakte von haploiden (fas 1-155 und fas 1-270) und diploiden ($\frac{\text{fas } 1-155}{\text{fas } 2-180}$ und $\frac{\text{fas } 1-270}{\text{fas } 2-180}$) fas-Mutanten sowie von 1:1 Mischungen verschiedener haploider fas-Mutanten mit Wildtyp-Zellen
- c) Rohextrakte verschiedener nicht-komplementierender CRM-positiver fas-Mutanten

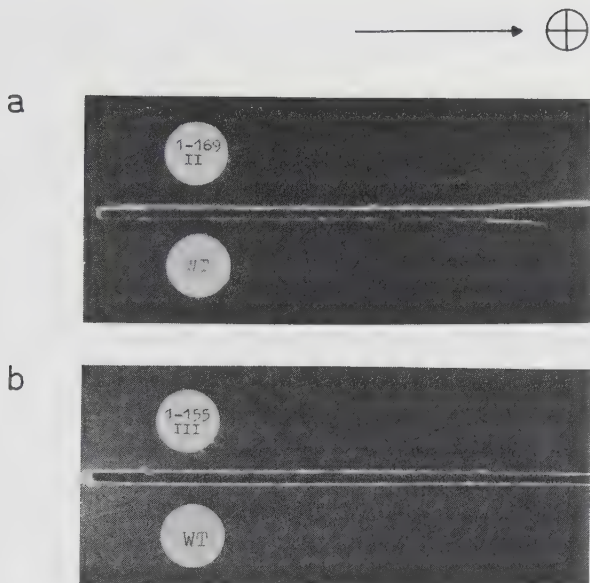


Fig. 14. Immunelektrophorese von Rohextrakten einer komplementierenden (a) und einer nicht-komplementierenden (b) fas-Missens-Mutante

Die Immunelektrophorese wurde nach der von GRABAR und WILLIAMS (58-60) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Agarose-beschichteten Objektträger wurden wie in Fig. 6 beschrieben hergestellt, nur wurde die Agarose hierbei nicht in physiologischer Kochsalzlösung, sondern dem Elektrophorese-Puffer gelöst. Zur Herstellung des Elektrophorese-Puffers wurden 5.5 g Barbitol in der Siedehitze in 250 ml dest. Wasser gelöst. Die mit Wasser auf 900 ml verdünnte Lösung wurde dann mit 0.1 N NaOH auf pH 8.9 gebracht und schließlich mit Wasser auf 1 000 ml Endvolumen aufgefüllt. In die ausgestanzten Löcher wurden ca. 8 μ l Antigen gegeben und dann die Elektrophorese 4 h bei 40°C und 280 Volt durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde in die Rinne 50 μ l Fettsäuresynthetase-Antiserum gefüllt und die Objektträger 1-2 Tage bei 40°C inkubiert.

Römische Zahlen hinter den Mutanten-Nummern geben die Komplementationsgruppe an.

Tab. 4 Nachweis von Fettsäuresynthetase-CRM in unterschiedlich verdünnten Hefe-Rohextrakten

Der Aufschluß der Zellen erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Zugabe von 2% SDS zum Extrakt sofort nach dem Aufschluß in Gegenwart von 10% Mercaptoäthanol. Verdünnung mit 0.02 M Na-Phosphat-Puffer pH 6.5.

Rohextrakt- Herkunft	Behandlung	Immunpräzipitat-Bildung							
		Verdünnung							
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:25	1:40	
Bäckerhefe "	(-SDS)	+	+	+	+	-	-	-	
	(+SDS)	+	+	+	+	+	-	-	
Wildtyp "	(-SDS)	+	+	+	+	+	+	-	
	(+SDS)	+	+	+	+	+	+	-	

(Tab. 4). Demnach kann man sagen, daß die CRM-negativen fas-Mutanten bestimmt weniger als 4% Fettsäuresynthetase-CRM enthalten als Wildtyp-Zellen.

(b) Immun-Doppeldiffusions-Analyse von Fettsäuresynthetase-CRM nach Denaturierung des Enzyms mit SDS

Die Immun-Doppeldiffusions-Analyse wurde in dieser Arbeit ganz allgemein so durchgeführt, daß Antiserum und Probe mindestens 12 h bei 40°C aufeinander zu diffundierten, bevor die Präzipitation erfolgte. Es wäre denkbar, daß während dieser Zeit, vor allem bei Verwendung eines rohen Zellextraktes, ein ursprünglich vorhandenes, jedoch labiles CRM, abgebaut wird und somit dem Nachweis entgeht. Zur Verhinderung eines solchen zu befürchteten Abbaus wurde daran gedacht, durch Zusatz von SDS zur Probe die Proteasewirkung zu hemmen ohne gleichzeitig die immunologischen Eigenschaften der Fettsäuresynthetase zu zerstören. In einem Vorversuch hierzu war geklärt worden, daß die Gegenwart von 0.1% SDS in der Antikörper-Probe mit der Ausbildung von Immunpräzipitationslinien im Immun-Doppeldiffusionstest nicht interferiert (Fig. 15). Im Hauptversuch wurden SDS-denaturierte Zellextrakte von komplementierenden wie nicht-komplementierenden fas-Mutanten untersucht. Wie Fig. 15 zeigt wurde allerdings durch den SDS-Zusatz keine Änderung des CRM-negativen Charakters der untersuchten Mutanten erreicht. Ein Abbau der Fettsäuresynthetase in diesen Mutanten schon in der intakten Zelle oder aber im Extrakt durch SDS-denaturierte Proteasen kann allerdings durch diesen Versuch nicht ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, daß SDS den Fettsäuresynthetase-Komplex in seine Untereinheiten dissoziiert, geht aus der Beobachtung hervor, daß das Molekulargewicht des Enzyms, gemessen an seiner Sedimentationsgeschwindigkeit im Saccharose-Dichtegradienten, durch SDS-Zugabe drastisch verringert wird (Fig. 16a, b). Durch SDS-Gelelektrophorese der Spitzenfraktionen der verschiedenen Proteingipfel (Fig. 16c) wurde sichergestellt, daß praktisch dieselben Fettsäuresynthetase-Untereinheiten einmal in Abwesen-

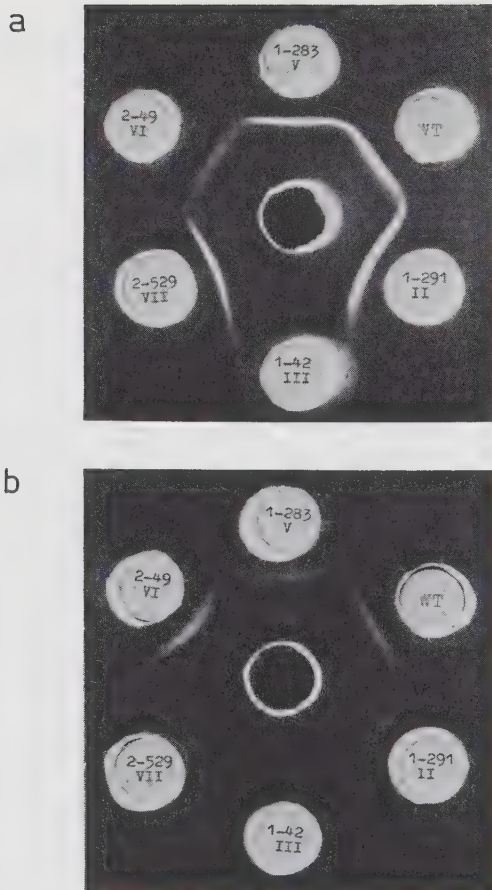


Fig. 15. Immundefusions-Analyse von nativen (a) und SDS-denaturierten (b) Hefe-Rohextrakten mit spezifischem Fettsäuresynthetase-Antiserum

Zur experimentellen Durchführung vgl. Fig. 6.

Römische Zahlen geben die Komplementationsgruppe, arabische Zahlen den fas-Genort bzw. die Allel-Nummern an.

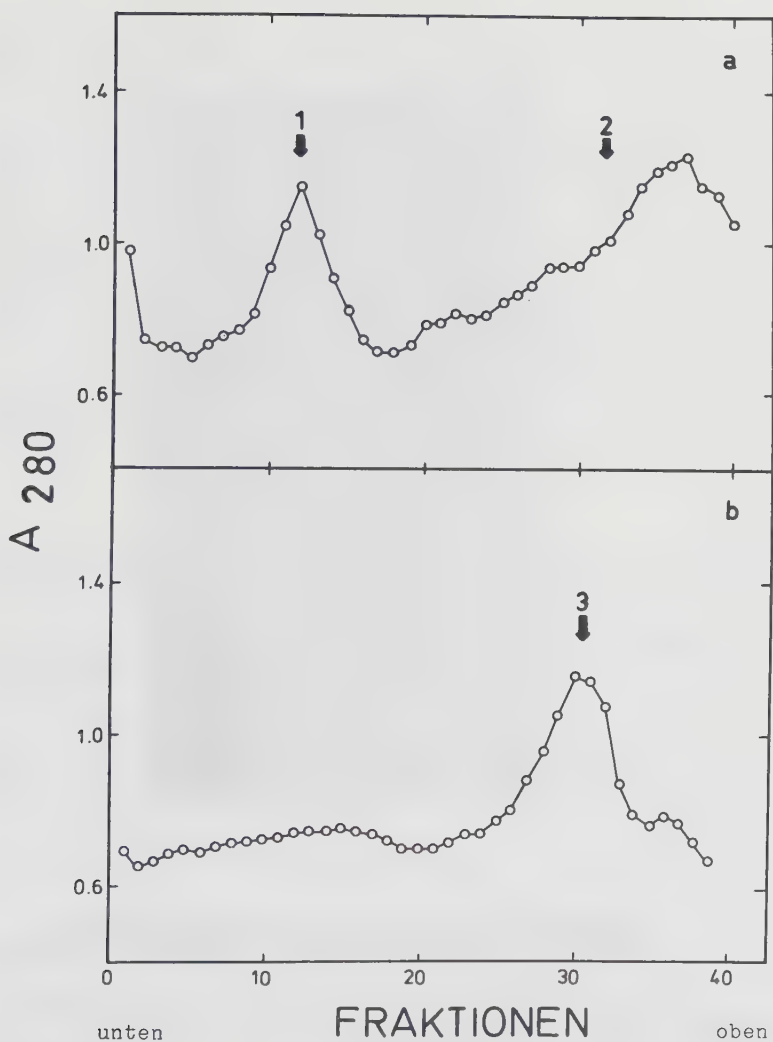


Fig. 16. Sedimentation nativer sowie von SDS-denaturierter, gereinigter Wildtyp-Fettsäuresynthetase im Saccharose-Dichtegradienten

(Legende s.nächste Seite)



Fig. 16. Sedimentation von nativer (a) sowie von SDS-
denaturierter (b), gereinigter Wildtyp-Fettsäure-
synthetase im Saccharose-Dichtegradienten

Ca. 0.7 ml (ca. 4 mg) gereinigte Wildtyp-Fettsäuresynthetase wurden mit 2% SDS und 10% Mercaptoethanol für 1 h bei 22°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe gegen 2 Liter 0.01 M Na-PO₄-Puffer pH 6.8 für 2 h bei 20°C dialysiert und dann auf einen SDS-freien 10-50% Saccharose-Gradienten gegeben (b). Als Kontrolle wurde natives Enzym ohne Detergens mit-zentrifugiert (a). Nach 15 h Zentrifugation bei 23 000 UpM in einem Spinco SW 25 Rotor wurde die Position der Proteinbanden in beiden Proben bestimmt und mit einem Aliquot (0.02 ml) der in a und b durch Pfeile gekennzeichneten Fraktionen 1-3 eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt (Gele 1-3 in c).

heit von SDS sich als Aggregat am Boden des Gradienten befinden (Fig. 16a), oder aber in Gegenwart von SDS offenbar dissoziiert an seiner Oberfläche bleiben (Fig. 16b). Aus einem weiteren Experiment ging hervor, daß auch bei Verwendung eines SDS-freien Saccharose-Gradienten eine SDS-denaturierte Enzymprobe unter den üblichen Bedingungen nicht zum Boden des Gradienten sedimentierte, sondern sich wie in Fig. 16b gezeigt verhielt. Aus den geschilderten Befunden geht einmal hervor, daß SDS zwar die Fettsäuresynthetase dissoziiert, dabei aber nicht alle ihre immunologischen Determinanten zerstört und zum anderen, daß auch die isolierten Fettsäuresynthetase-Untereinheiten eine immunologisch noch dem intakten Komplex verwandte Protein-Konformation aufweisen.

B. UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR DES FETTSÄURESYNTHETASE-KOMPLEXES

1. Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren in den Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B

Wie schon in der Einleitung erwähnt, enthält die Fettsäuresynthetase der Hefe insgesamt zwei verschiedene C-terminale Aminosäuren, Lysin und Valin. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob diese die C-Termini der beiden bekannten Komplex-Untereinheiten A und B darstellten.

Dazu wurde zunächst der gereinigte Fettsäuresynthetase-Komplex der Mutante fas 1-192, von dem bekannt ist, daß er - anders als der Wildtyp-Komplex - fast keine Komponente C enthält und nur aus den beiden Untereinheiten A und B besteht, durch präparative SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese in diese beiden Komponenten aufgetrennt. Die Proteinbanden im Gel wurden kurz angefärbt (Fig. 17), einzeln aus dem Gel herausgeschnitten und mit einem Gemisch der Carboxypeptidasen A und B behandelt. Das Hydrolysat wurde im Aminosäure-Analysator untersucht. Die dabei erhaltenen Chromatogramme sind im Anhang (Fig. 28-30) enthalten. Aus ihnen wurde die Aminosäurezusammensetzung der Hydrolysate berechnet (Tab. 5). Ein Vergleich der

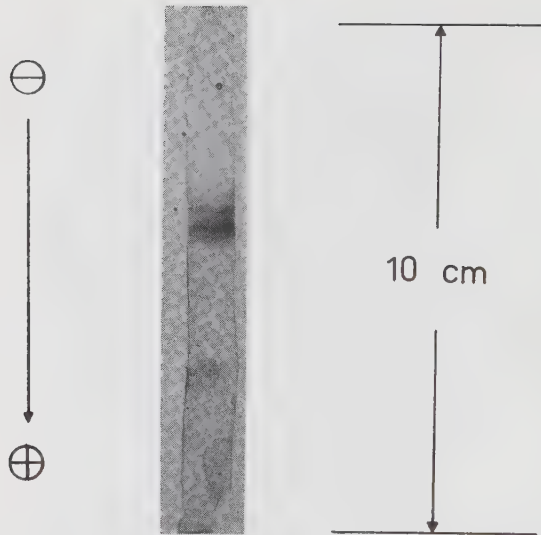


Fig. 17. Präparative Trennung der Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B durch SDS-Flachgelelektrophorese

Experimentelle Durchführung vgl. Material und Methoden

Tab. 5 Quantitative Bestimmung der aus den Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B mit Carboxypeptidasen freigesetzten Aminosäuren

Bzgl. der exp. Durchführung vgl. Material und Methoden. Zur quantitativen Auswertung der Chromatogramme wurden die den einzelnen Aminosäuren entsprechenden Gipfel planimetriert und der dabei erhaltene Wert mit einem für jede Aminosäure charakteristischen Faktor multipliziert.

Aminosäure	Empirischer Faktor	Aminosäurezusammensetzung des Hydrolysats		
		A	B	A/B ⁺
		n Mole	n Mole	
arg	100	3.01	3.32	1.0 / 1.1
lys	116	11.50	1.26	9.2 / 1.0
his	109	1.78	3.15	1.0 / 1.7
phe	100	3.77	3.42	1.1 / 1.0
tyr	97	1.44	1.87	1.0 / 1.3
leu	96	1.69	1.65	1.0 / 1.0
ile	93	1.90	3.78	1.0 / 2.0
met	91	1.33	2.51	1.0 / 1.9
val	89	3.60	25.40	1.0 / 7.2
ala	77	4.20	5.85	1.0 / 1.4
gly	96	4.65	1.50	3.1 / 1.0
pro	16	9.60	11.52	1.0 / 1.2
glu	79	8.30	12.42	1.0 / 1.5
ser	77	9.10	7.60	1.2 / 1.0
thr	79	1.09	2.32	1.0 / 1.9
asp	68	2.63	2.64	1.0 / 1.6
cys	-	1.56	1.54	1.0 / 1.0

+ In jedem Werte-Paar wurde der niedrigere Wert stets = 1 gesetzt

mit den beiden Untereinheiten A und B erhaltenen Werte zeigt, daß Lys offensichtlich den C-Terminus der Komponente A und Val denjenigen der Komponente B darstellt (Tab. 5). In beiden Fällen ist der Gehalt des Hydrolysats an dieser einen Aminosäure 7-9 mal höher als bei der jeweils anderen Komponente. Dieses Ergebnis stellt eine gute Stütze des Zwei-Ketten-Modells der Fettsäuresynthetase aus Hefe dar.

2. Versuche zur Anreicherung des abnormalen Fettsäuresynthetase-CRM aus nicht-komplementierenden fas-Mutanten

Im Interesse einer besseren Kenntnis des Aggregations-Mechanismus der Fettsäuresynthetase-Untereinheiten erschien es wünschenswert, daß in einigen nicht-komplementierenden fas-Mutanten synthetisierte "abnormale" (vgl. S. 55) Fettsäuresynthetase-CRM zu reinigen und proteinchemisch näher zu charakterisieren. Möglicherweise handelte es sich hierbei um Vor- oder Zwischenstufen bei der Assoziation der Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B zum fertigen hexameren Komplex A_3B_3 . Es wurde daher versucht, aus der Mutante fas 1-155 das Fettsäuresynthetase-analoge CRM anzureichern.

Erstens wurde versucht, das fas 1-155 Mutanten-Enzym nach der für das Wildtyp-Enzym gültigen Methode zu isolieren. Ursprünglich sollte als Nachweis während der Anreicherung die δ -Acetyl-CoA-Methyltransferase-Aktivität benutzt werden. Dieses Enzym ist fas 1-kodiert und sollte daher in fas 1 Mutanten noch aktiv sein. Es zeigte sich jedoch, daß es nicht nur in den CRM-positiven fas 1-Mutanten, sondern auch in den CRM-negativen fas 1-Mutanten wenig mehr nachweisbar war (Tab. 6). Das hypothesisierte Mutantenenzym wurde daher "blind" analog dem Wildtyp-Enzym angereichert und die schließlich erhaltene Enzympräparation der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation unterworfen. Dabei zeigte sich an der für das Wildtyp-Enzym charakteristischen Position (Fraktion 7-11 in Fig. 18b) nur ein ausserordentlich schwacher Protein-, aber ein deutlicher Enzymaktivitäts-Peak. Ein immunologischer Vergleich dieses Enzyms mit Wildtyp-Fettsäurese einerseits und mit dem Mutanten-CRM

Tab. 6. β -Ketoacyl-Reduktase-Aktivität im Zellextrakt von nicht-komplementierenden, OMM-positiven fas-Mutanten

Die Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben aufgeschlossen und die Rohextrakte wurden enzymatisch und immunologisch getestet.

Stamm-Nr.	Komplementations- gruppe	rel. β -Ketoacyl- Reduktase-Aktivität	Immun- reaktion
		%	
Wildtyp	-	100	+
fas 1- 93	II	87.5	+
fas 1-105	V	90.5	+
fas 1-155	III	0	+
fas 1-270	III	0	+
fas 2-394	IV	0	-
fas 1-104	III	0	-

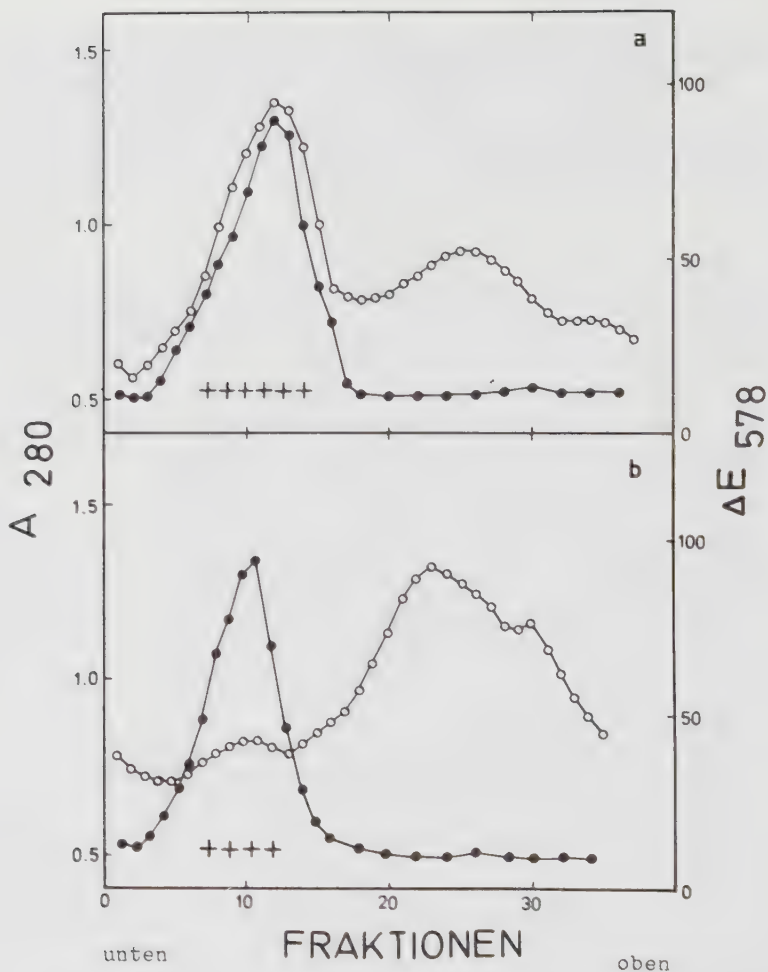


Fig. 18. Dichtegradienten-Zentrifugation von gereinigten Fettsäuresynthetase-Präparationen aus Wildtyp-Zellen (a) und aus der nicht-komplementierenden Missens-Mutante fas 1-155 (b)

Zentrifugation: 15 h bei 100 000 x g (23 000 UpM) in einem Spinco SW 27 Rotor) und bei 40°C.

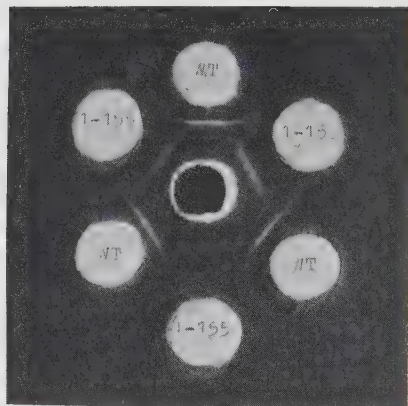
- o = Absorption bei 280 nm
- = B-Ketoacyl-Reduktase-Aktivität
- + = CRM-positive Fraktionen bei Immun-Doppeldiffusionsanalyse mit spezifischem Fettsäuresynthetase-Antiserum

andererseits ergab jedoch, daß es sich bei diesen Fraktionen um Wildtyp-Enzym und nicht um das Mutanten-CRM handeln mußte (Fig. 19). Diese Fraktionen waren nicht nur enzymatisch voll aktiv, sondern auch immunologisch nicht von Wildtyp-Synthetase verschieden, so wie dies für das fas 1-155-CRM im Zellrohextrakt in charakteristischer Weise der Fall ist (Spornbildung vgl. Fig. 13b). Es wird daher geschlossen, daß das Mutanten-CRM sich nicht wie der Wildtyp-Komplex anreichern ließ, sondern daß es dabei verloren ging und daß statt dessen ein in geringer Menge in dieser Mutante als Nebenprodukt synthetisiertes Wildtyp-Enzym spezifisch angereichert wurde.

Zur Kontrolle der Anreicherung des Mutanten-CRM wurden daher in den folgenden Versuchen die verschiedenen Fraktionen jeweils durch Immun-Doppeldiffusions-Analyse untersucht, wobei die schon erwähnte "Sporn"-Bildung im Vergleich zum Wildtyp-Enzym als Kriterium für den Mutanten-Charakter diente.

Dabei zeigte sich, daß das Mutanten-CRM zwar durch Ammonsulfat-Fraktionierung und Ca-Phosphatgeladsorption in derselben Weise wie das Wildtyp-Enzym angereichert wird, daß es jedoch bei der anschließenden Sedimentation in der Ultrazentrifuge keinen Niederschlag bildet, sondern im Überstand bleibt (Tab. 7). Aus diesem Überstand wurde es durch Ausfällen mit Ammonsulfat konzentriert. Eine anschließende Chromatographie an DEAE-Zellulose erbrachte eine Auftrennung der Präparation in 4 Fraktionen, von denen eine das Mutanten-CRM enthielt (Fig. 20a und b). Diese Fraktionen wurden wiederum konzentriert und dann in einem Saccharose-Dichtegradienten sedimentiert. Wie aus Fig. 21b hervorgeht, enthielt dieser Gradient dann aber nur noch niedermolekulares, langsam sedimentierendes Material, welches keine Kreuzreaktion mit dem Fettsäuresynthetase-Antiserum mehr zeigte. Eine zum Vergleich denselben Anreicherungs-Methoden unterworfenen Enzympräparation aus Wildtyp-Zellen enthielt nach denselben Reinigungsschritten deutlich noch rasch sedimentierende CRM-positive Fettsäure-

a



b

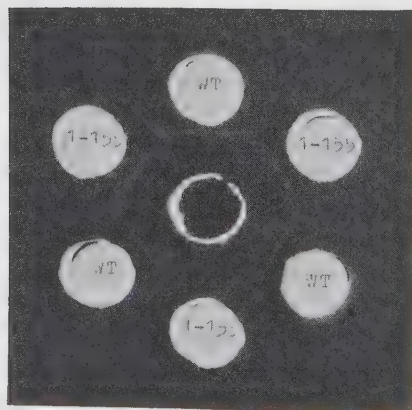


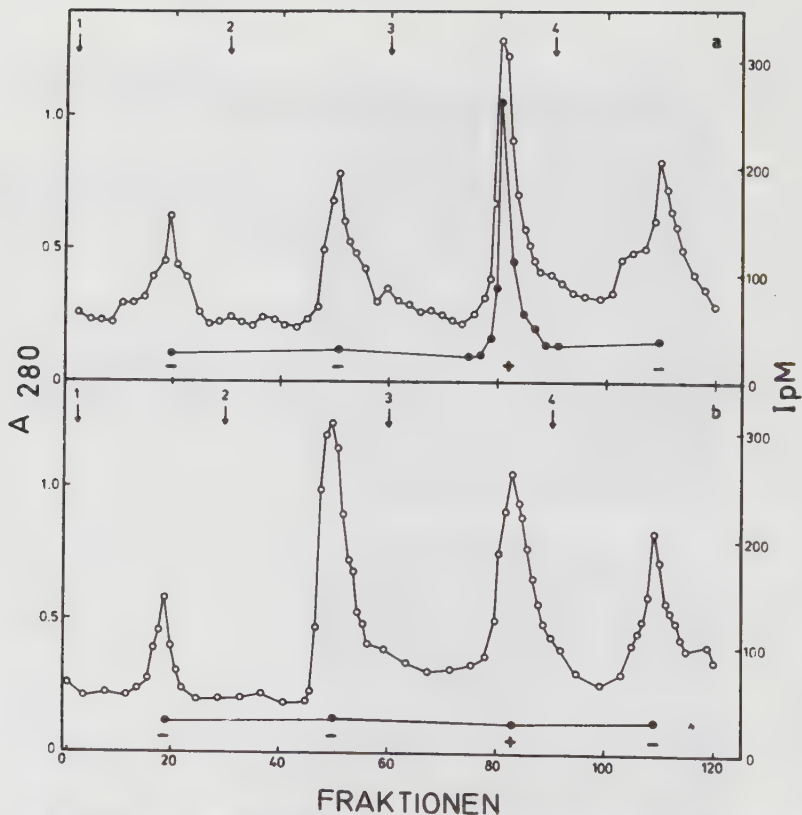
Fig. 19. Immendiffusions-Analyse verschiedener Fraktionen der Anreicherung von fas 1-155-Fettsäuresynthetase

- Zur experimentellen Durchführung vgl. Fig. 6.
 (a) Vergleich der Rohextrakte von Wildtyp-Zellen und fas 1-155-Zellen nach dem Zellaufschluß
 (b) Untersuchung der Spitzenfraktionen aus Fig. 18a,b

Tab. 7 Anreicherung von Fettsäuresynthetase-CRM aus der nicht-komplementierenden Mutante fas 1-155

Bei der vergleichenden Immundoppeldiffusions-Analyse von Mutanten-CRM mit Wildtyp-Synthetase wurde als "Spornbildung" ein Verhalten entsprechend Fig. 19a, als "Ringbildung" ein solches entsprechend Fig. 19b bezeichnet.

Reinigungs- Schritt	Fraktion	Immunreaktion	
		Spornbildung	Ringbildung
1	Zellhomogenisat	+	-
2	Ammonsulfat-Fraktio- nierung 0-35%		
	a) Überstand	-	-
	b) Niederschlag	-	-
3	Ammonsulfat-Fraktio- nierung 35-50%		
	a) Überstand	-	-
	b) Niederschlag	+	-
4	Dialysat von (3b)	+	-
5	Ca-Phosphatgel-Behand- lung von (4): Überstand	+	-
6	Ammonsulfat-Fraktio- nierung von (5) 0-35%		
	a) Überstand	-	-
	b) Niederschlag	-	-
7	Ammonsulfat-Fraktio- nierung von (6) 35-50%		
	a) Überstand	-	-
	b) Niederschlag	+	-
8	Ultrazentrifugation von (7b)		
	a) Überstand	-	-
	b) Niederschlag	-	+
9	Ultrazentrifugation von (8b)		
	a) Überstand	-	-
	b) Niederschlag	-	+
10	Saccharose-Dichte- gradient von (9b) Spitzenfraktion	-	+
11	Konzentrat von (8a)	+	-



C

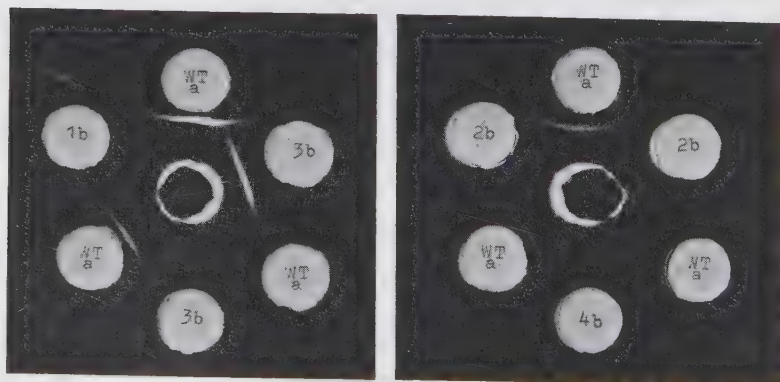


Fig. 20 Chromatographie von fas 1-155-CRM (b) sowie von Wildtyp-Fettsäuresynthetase (a) an DEAE-Cellulose, sowie immunologische Charakterisierung der dabei erhaltenen Fraktionen (c)

(Legende s. nächste Seite)

Fig. 20. Chromatographie von fas 1-155-CRM (b) sowie von Wildtyp-Fettsäuresynthetase (a) an DEAE-Cellulose

Bezüglich Einzelheiten der experimentellen Durchführung vgl. Material und Methoden.

Schrittweise Elution mit Kaliumphosphat-Puffer pH 6.5 (1-4) von steigender Molarität:

1 = 0.01 M Kalium-Phosphat

2 = 0.075 M " "

3 = 0.20 M " "

4 = 0.40 M Kalium-Phosphat

o = Absorption bei 280 nm

● = Radioaktivität

+ bzw. - = positive bzw. negative Immunreaktion bei Analyse der Spitzenfraktionen durch Immun-Doppeldiffusion gegen spezifisches Fettsäuresynthetase-Antiserum

c) Immun-Doppeldiffusionsanalyse konzentrierter Spitzenfraktionen aus (a) und (b).

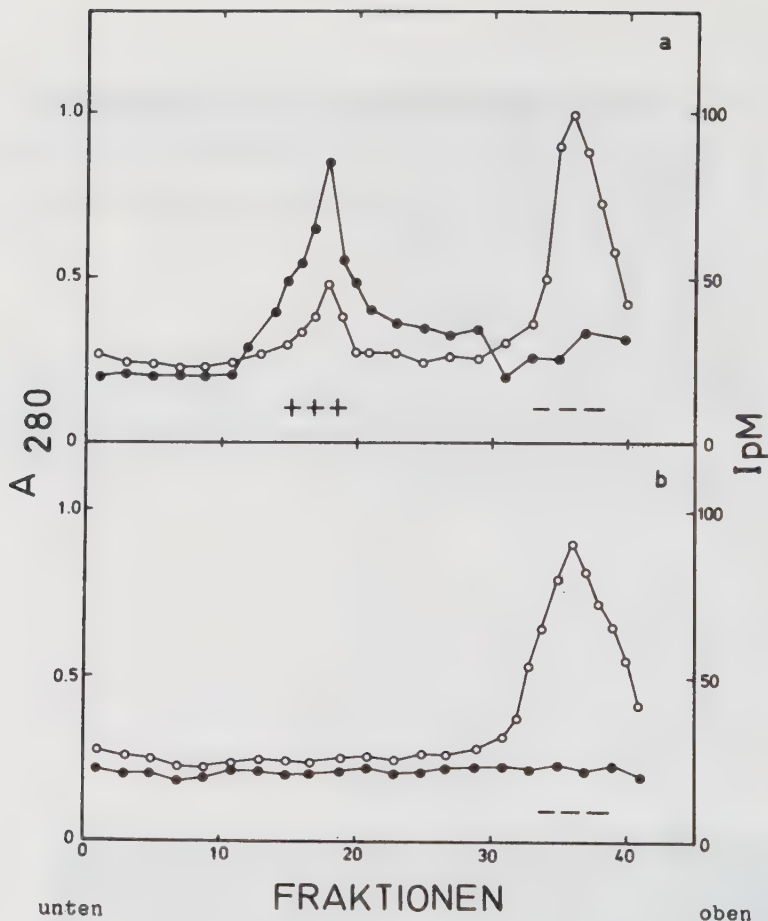


Fig. 21. Sedimentation der CRM-positiven Fraktionen aus Fig. 20 im Saccharose-Dichtegradienten

Bezüglich Einzelheiten der experimentellen Durchführung vgl. Material und Methoden

- a) ^{14}C -Pantotheinsäure-markiertes Wildtyp-Enzym
 b) ^{14}C -Pantotheinsäure-markierte fas-1-155-Präparation

○ = Absorption bei 280 nm

● = Radioaktivität

+ bzw. - = positive bzw. negative Immunreaktion bei Analyse der Spitzenfraktionen durch Immun-Doppeldiffusion gegen spezifisches Fettsäuresynthetase-Antiserum

synthetase-Fraktion (Fig. 21a). Da auch schon bei den vorhergehenden Anreicherungs-Schritten bei dem abnormalen Mutanten-Enzym eine stetige Abnahme der Intensität der Immunantwort mit fortschreitender Enzymreinigung beobachtet worden war, wurden die Versuche an dieser Stelle abgebrochen. Offenbar ist das abnormale Mutanten-CRM proteolytisch zu labil, als daß es in nennenswertem Umfang in reiner Form isoliert werden könnte.

Stattdessen wurde versucht, die Zersetzung des offensichtlich labilen Mutanten-Proteins während eines langwierigen Anreicherungsprozesses dadurch zu vermeiden, daß das Mutanten-CRM aus dem Rohextrakt durch Immunpräzipitation herausgefällt und anschließend die Fällung proteinchemisch charakterisiert wurde. Fig. 22 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe. Es stellte sich heraus, daß die Immunpräzipitation sowohl vom Wildtyp- wie auch vom Mutanten-CRM aus dem Rohextrakt möglich ist. Bei der anschließenden SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Präzipitates ergaben sich jedoch Bandenmuster, die zwar jeweils für komplementierende, nicht-komplementierende fas 1- und nicht-komplementierende fas 2-Mutanten untereinander sehr ähnlich waren, aus denen jedoch noch nicht ohne weiteres eine Deutung der proteinchemischen Natur des betreffenden CRM möglich war. Möglicherweise liegen schon in den intakten Mutantenzellen nur noch modifizierte Fettsäuresynthetase-Untereinheiten vor. Für detailliertere Aussagen müßten daher derartige Versuche in systematischer Form wiederholt werden.

3. Vergleichende Untersuchung gereinigter SDS-denaturierter fas-Mutanten Enzyme

Durch SDS-Flachgelelektrophorese sollten die Bandenmuster von ca. 40 verschiedenen aus früheren Versuchen noch zur Verfügung stehenden gereinigten Mutanten-Fettsäuresynthetasen untersucht werden. Es galt dabei die Frage zu klären, ob die Fettsäuresynthetase in verschiedenen Missens-Mutanten stets dasselbe, Wildtyp-ähnliche Bandenmuster aufweist, oder ob in manchen Fällen davon abweichende Muster auftreten. Derartige Ab-

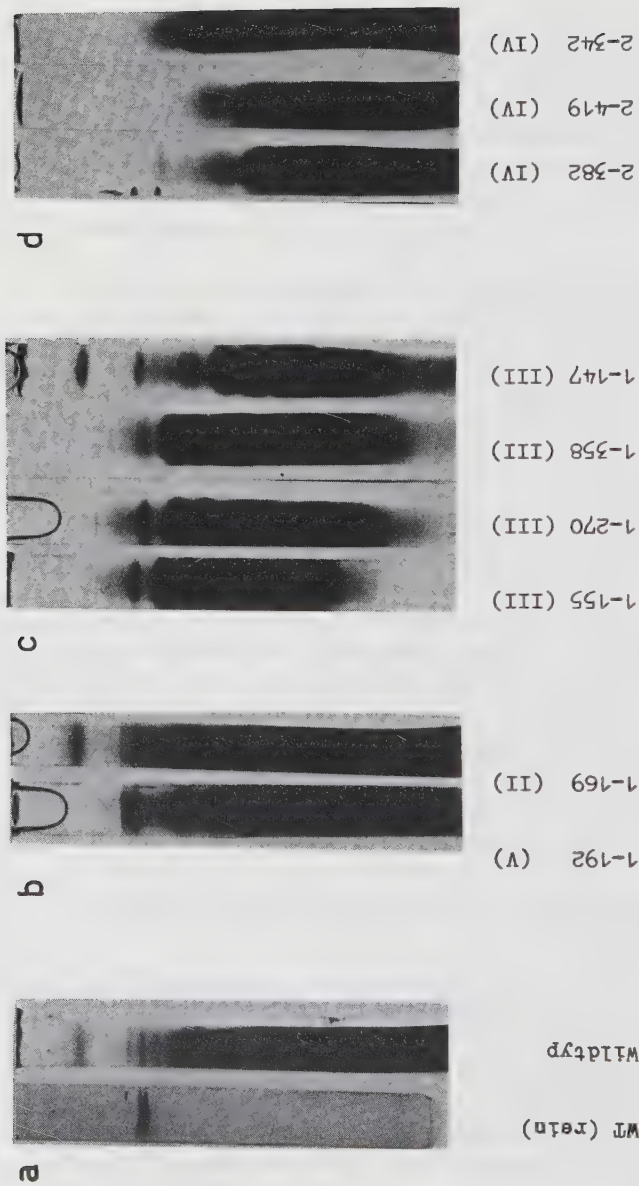


Fig. 22. SDS-Gelelektrophorese von Immunpräzipitaten aus Hefezellen-Rohextrakt

Bezüglich experimenteller Einzelheiten vgl. Material und Methoden. Römische Zahlen geben die Komplementationgruppen an, arabische Zahlen den fas-Locus bzw. die Allel-Nummern.

a) Wildtyp-Extrakt, b) Rohextrakte komplementierender fas-1-Mutanten, c) Rohextrakte nicht-komplementierender fas-1-Mutanten, d) Rohextrakte nicht-komplementierender fas-2-Mutanten

weichungen könnten etwa bei bestimmten Aminosäureaustausch-, Kettenverlängerungs- oder Kettenverkürzungs-Mutationen erwartet werden. Aus Fig. 23 geht hervor, daß in den meisten Fällen das übliche Zwei-Banden-Muster der Hefe-Fettsäuresynthetase zu beobachten war. In einigen Fällen trat auch das vom Wildtyp und einigen anderen Mutanten her bekannte Drei-Banden-Muster auf (z.B. fas 2-15, fas 2-18, fas 2-80). Weiterhin ist in einigen Fällen eine relative Abschwächung der oberen, schweren Banden gegenüber der unteren festzustellen (z.B. fas 1-288, fas 1-293, fas 1-294) was in wenigen extremen Fällen bis zum völligen Verschwinden der oberen Bande führen konnte (z.B. fas 1-160, fas 2-385, fas 2-331). Eine gelegentlich beobachtete Verschiebung der Position beider Protein-Banden im Vergleich zu ihrer Position bei anderen Mutanten (z.B. zwischen fas 2-300 und fas 2-325) ist jedoch wahrscheinlich nicht auf proteinchemische Unterschiede zwischen diesen Mutanten-Enzymen zurückzuführen, da sich diese Verschiebung bei einer Wiederholung des Versuchs in keinem Fall als reproduzierbar erwies (nicht gezeigt). Ebenso konnte ein ungewöhnliches Ein-Banden-Muster mit einer neu isolierten Enzympräparation ebenfalls in ein normales Zwei-Banden-Muster überführt werden.

Man kann aus diesen Ergebnissen schließen, daß das Auftreten eines Zwei- oder Drei-Banden-Musters bei der SDS-Gelelektrophorese des gereinigten Wildtyp- oder Mutanten-Fettsäuresynthetase-Komplexes eine allelspezifische Eigenschaft ist, daß aber darüber hinaus keine qualitativen Unterschiede zwischen den Bandenmustern verschiedener fas-Mutanten-Enzyme zu beobachten sind.

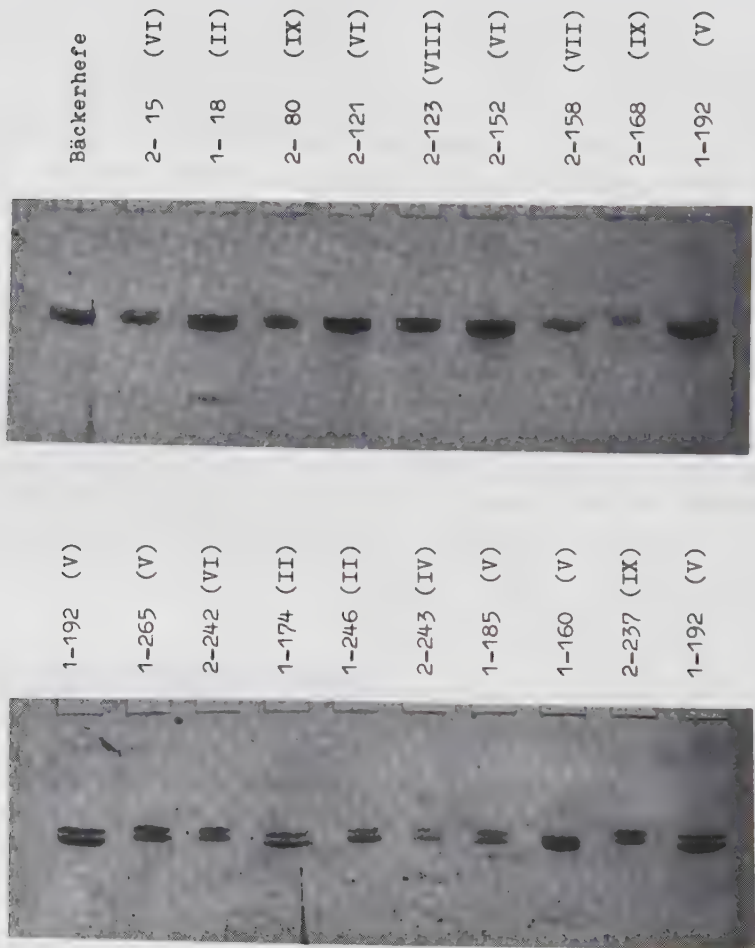


Fig. 23. SDS-Flachgelelektrophorese von gereinigten Fettsäure-synthetase-Präparationen aus verschiedenen fas-Mutanten
(Legende s. nächste Seite)

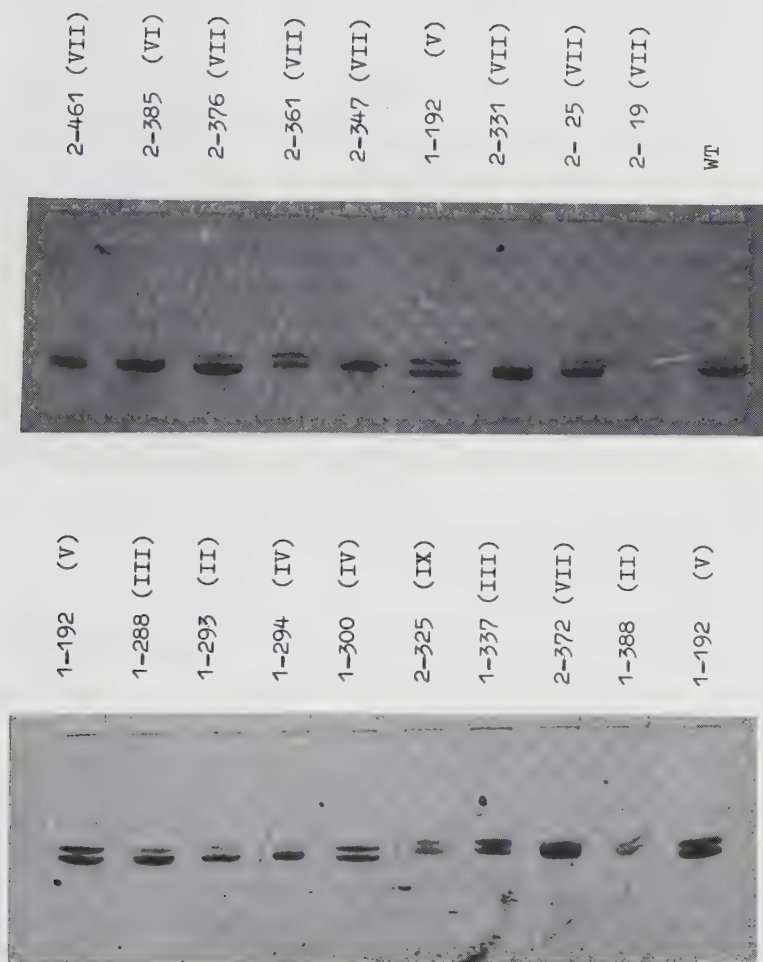


Fig. 23. SDS-Flachgelelektrophorese von gereinigten Fettsäure-synthetase-Präparationen aus verschiedenen fas-Mutanten

Zur experimentellen Durchführung vgl. Material und Methoden. Römische Zahlen geben die Komplementationsgruppe, arabische Zahlen den fas-Locus bzw. die Allel-Nummern an.

4. Versuche zur präparativen Trennung der beiden Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B

Wie bereits erwähnt, kann eine Trennung des Fettsäuresynthetase-Komplexes in die beiden Untereinheiten A und B durch SDS-Gelelektrophorese erreicht werden. Da jedoch SDS bekanntlich Proteine irreversibel denaturiert, schien diese Methode für eine Isolierung enzymatisch intakter Untereinheiten nicht geeignet. Statt dessen wurde im folgenden versucht, die Fettsäuresynthetase durch isoelektrische Focussierung unter Erhaltung ihrer antigenen und enzymatischen Eigenschaften aufzutrennen. Weiterhin sollte durch analytische isoelektrische Focussierung in Gegenwart von Harnstoff die 2-Untereinheiten-Struktur des Fettsäuresynthetase-Komplexes bestätigt werden. Da die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nur nach dem Prinzip der Protein-Größe trennt, ließ die Dissoziation der Fettsäuresynthetase in zwei Komponenten auch den Schluß zu, daß es sich hierbei um zwei Komponenten-Gruppen handelt, wobei innerhalb einer Gruppe alle Komponenten dasselbe Molekulargewicht hatten. Die isoelektrische Focussierung als ein anderes Trennprinzip, nämlich nach der elektrischen Ladung, sollte in dem letztgenannten Fall eine weitere Auftrennung des Fettsäuresynthetase-Komplexes in mehr als nur zwei Komponenten erbringen.

Fig. 24 zeigt, daß der gereinigte Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe durch analytische isoelektrische Focussierung in Polyacrylamidgelen in Gegenwart von 6 M Harnstoff ebenfalls nur in zwei unterscheidbare Komponenten aufgetrennt wird. Um diese beiden Hauptkomponenten herum treten allerdings noch eine Reihe weiterer, jedoch wesentlich schwächer gefärbte Proteinbanden im Gel auf. Wie schon oben erwähnt, ist dieser Befund eine Stütze der Zwei-Komponenten-Struktur des Fettsäuresynthetase-Komplexes der Hefe.

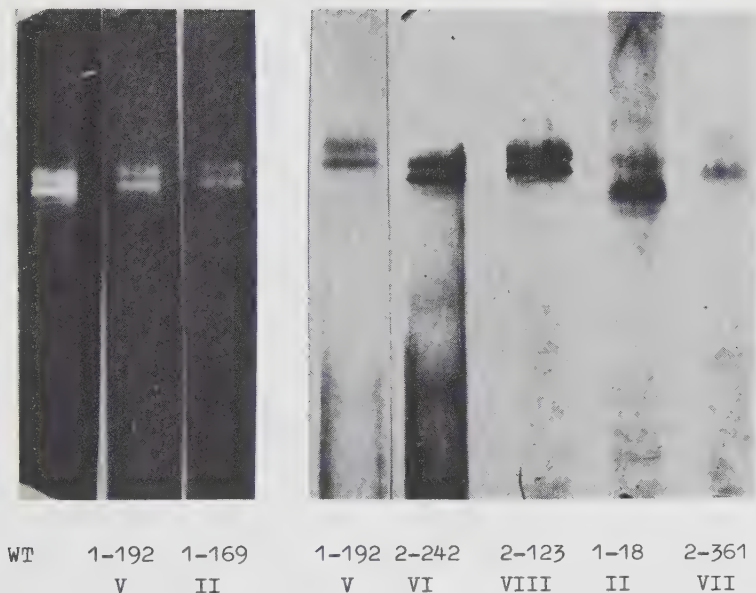


Fig. 24. Isoelektrische Focussierung gereinigter Fettsäure-synthetase-Präparationen im Polyacrylamidgel

Zur experimentellen Durchführung vgl. Material und Methoden. Römische Zahlen geben die Komplementationsgruppe, arabische Zahlen den fas-Locus bzw. die Allel-Nummern an. Die ersten drei Gele zeigen die durch TCA fixierten Protein-Banden vor dem Anfärben.

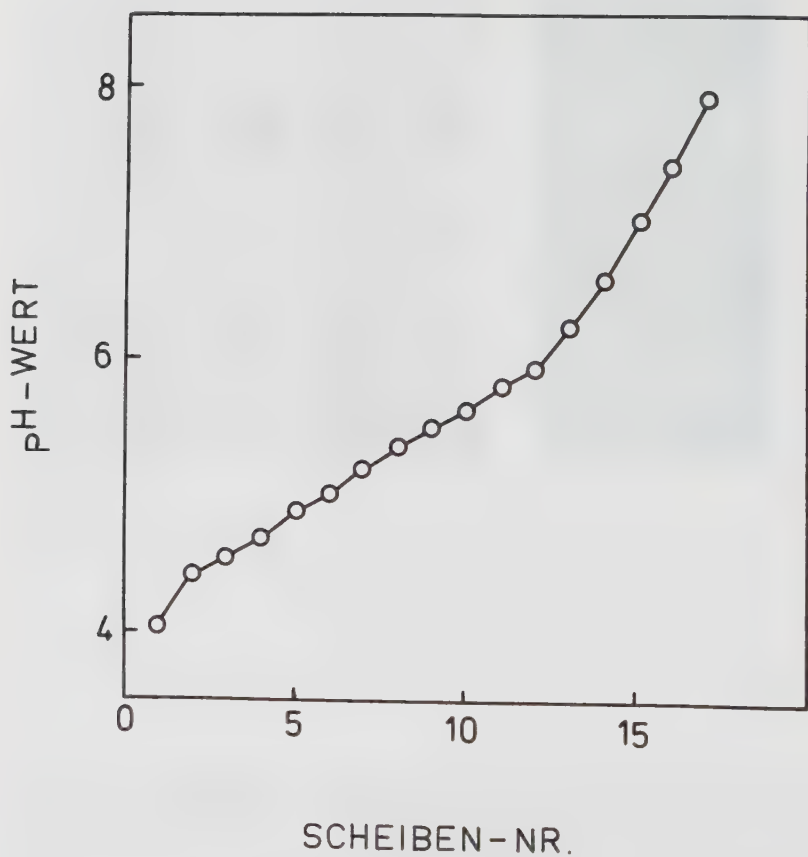


Fig. 25. pH-Gradient im Polyacrylamidgel nach isoelektrischer Focussierung

Zur experimentellen Durchführung vgl. Material und Methoden

Wurde die isoelektrische Focussierung der Fettsäuresynthetase in trägerfreiem Milieu in einer Flüssigkeitssäule im präparativen Maßstab durchgeführt, so wurde ebenfalls eine Auftrennung in zwei Komponenten erreicht (Fig. 26). Bei Verwendung von ^{14}C -Pantothensäure-markierter Fettsäuresynthetase war nur einer der beiden Protein-Gipfel radioaktiv markiert (Fig. 26c,d). Entsprechend den mit SDS-Gelelektrophorese erhaltenen Ergebnissen entspricht diese Komponente somit der Untereinheit A, während die andere, nicht markierte, die Komponente B sein dürfte. Ein durch aufeinanderfolgendes Einfrieren und Tauen in Gegenwart von 2 M LiCl zusätzlich dissoziiertes Enzym zeigte ebenfalls keine Auftrennung in noch mehr Komponenten (Fig. 26b)

Eine immunologische Untersuchung der durch isoelektrische Focussierung getrennten Fettsäuresynthetase-Komponenten ergab allerdings, daß die konzentrierten Spitzenfraktionen der Proteingipfel keinerlei Immunpräzipitationslinien mehr bildeten (nicht gezeigt). Diese Inaktivierung war offenbar nicht nur eine Folge der Denaturierung des Enzyms durch Harnstoff, sondern war wohl auch durch die Focussierung selbst bedingt. Denn auch im Harnstoff-freien Ampholine-Puffer zeigt weder das native noch das SDS-denaturierte Enzym nach isoelektrischer Focussierung noch immunologische Aktivität (Fig. 27). Daher eignet sich die Methode der isoelektrischen Focussierung offensichtlich in keiner Form für die präparative Gewinnung von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten mit noch ganz oder teilweise aktiver Protein-Konformation.

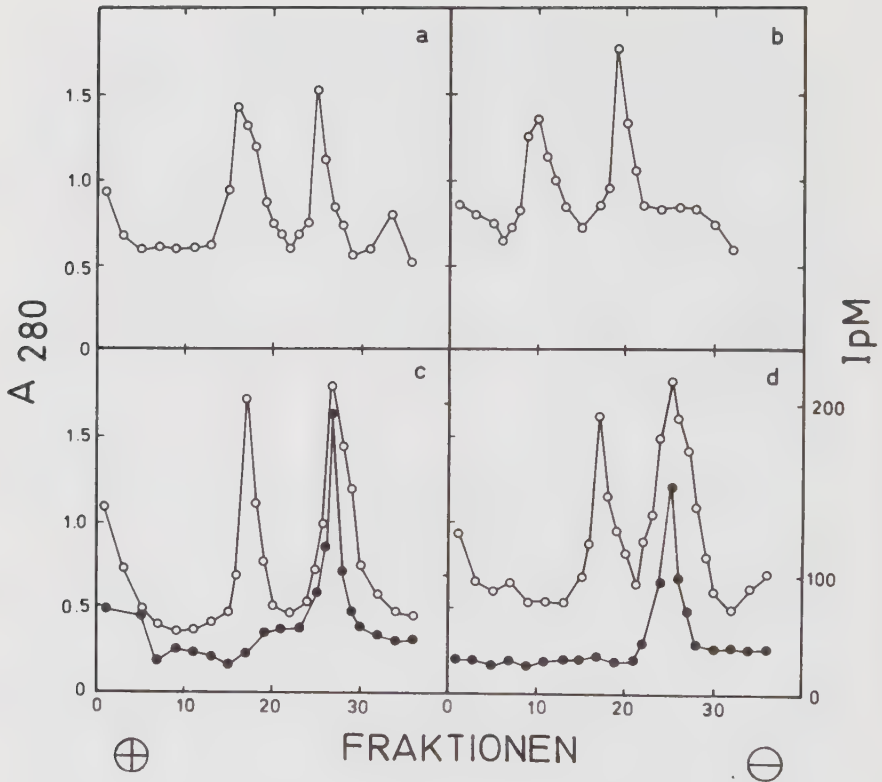


Fig. 26. Präparative isoelektrische Focussierung gereinigter Fettsäuresynthetase im Saccharose-Gradient in Gegenwart von 6 M Harnstoff

Zur experimentellen Durchführung vgl. Material und Methoden

- a) fas 1-192-Enzym
 - b) fas 1-192-Enzym nach Dissoziation mit 2 M LiCl (61,62)
 - c) ^{14}C -Pantothensäure-markierte Wildtyp-Fettsäuresynthetase
 - d) ^{14}C -Pantothensäure-markierte fas 2-121-Fettsäuresynthetase
- = Absorption bei 280 nm
● = Radioaktivität

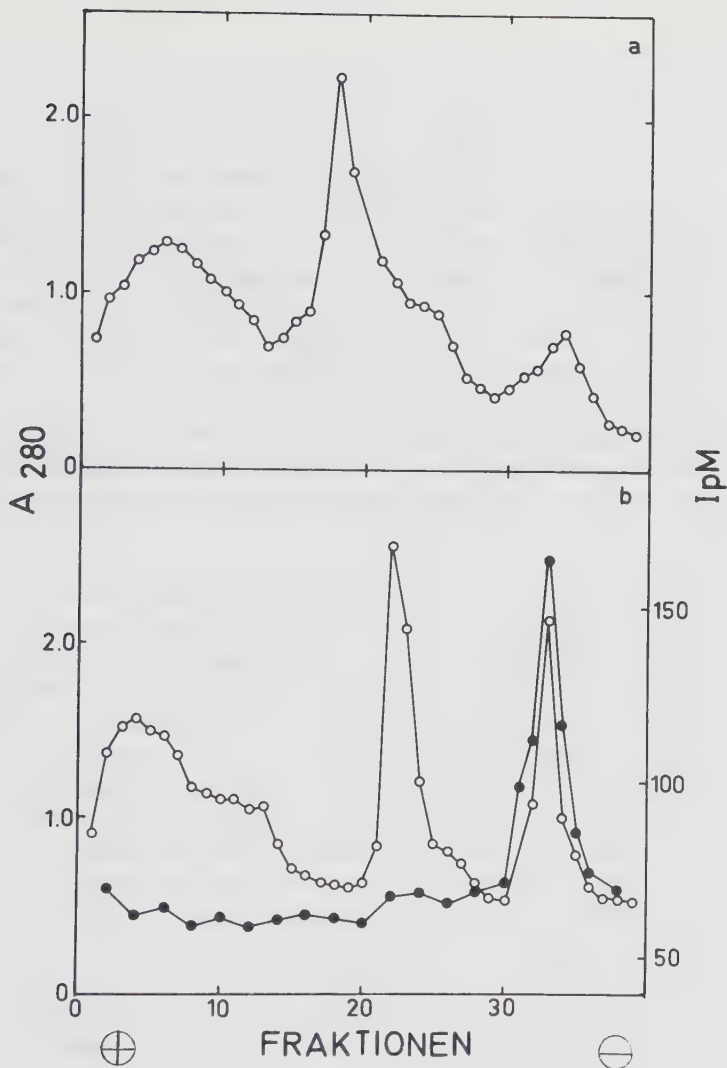


Fig. 27. Präparative isoelektrische Focussierung nativer (a) und gereinigter, SDS-denaturierter (b) Fettsäuresynthetase im Saccharose-Gradienten

Zur experimentellen Durchführung vgl. Material und Methoden.

- = Absorption bei 280 nm
- = Radioaktivität

IV. DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe nicht nur durch SDS-Gelelektrophorese, sondern auch durch isoelektrische Focussierung in Gegenwart von Harnstoff in nur zwei verschiedene Protein-Komponenten aufgetrennt werden kann. Die eine Komponente (B) besitzt Valin, die andere (A) Lysin als C-terminale Aminosäure. Aufgrund dieser Ergebnisse kann es zusammen mit früheren, genetischen und biochemischen Befunden als sicher gelten, daß die Fettsäuresynthetase grundsätzlich nur aus den beiden Untereinheiten A und B besteht. Der bekannte Gehalt an Pantothersäure (57) und FMN (63) des Komplexes spricht weiterhin dafür, daß es sich sehr wahrscheinlich um ein Hexamer A_6B_6 handelt.

Eine derartige Struktur bedingt, daß die Genprodukte von fas 1 und fas 2 jeweils zusammenhängende multifunktionelle Polypeptidketten darstellen. Demnach wären alle fas 1-Mutanten allele Mutanten, d.h. es dürfte theoretisch keine Komplementation zwischen ihnen zu beobachten sein. Entsprechendes gilt auch für fas 2-Mutanten. Trotzdem ist bekannt, daß ca. 50% aller fas 1 und fas 2 Mutanten mit anderen Mutanten desselben Genlocus komplementieren (64). Eine Erklärung dieses Phänomens könnte durch die Annahme von intragener Komplementation oder aber eines "Crossfeedings" von Zwischenprodukten der Fettsäure-Biosynthese zwischen den verschiedenen aktiven Zentren innerhalb des Komplexes gegeben werden (64).

Von den nicht-komplementierenden fas-Mutanten ist bekannt, daß sie im Gegensatz zu komplementierenden fas-Mutanten gewöhnlich kein immunologisch kreuzreagierendes Fettsäuresynthetase-analoges Material enthalten. Diese schon länger bekannte Tatsache wird durch die Experimente der vorliegenden Arbeit nochmals bestätigt. Andererseits hatten Suppressor-Studien an nicht-komplementierenden fas 1-Mutanten (11) und Komplementationsversuche mit temperatur-sensitiven fas 1 und fas 2-Mutan-

ten gezeigt, daß unter nicht-komplementierenden Mutanten sich nicht nur Nonsense- und Rasterverschiebungs- (12,13), sondern auch viele Missens-Mutanten befinden (51). Demnach hat es den Anschein, als ob die Voraussetzung für den nicht-komplementierenden Charakter von fas-Mutanten nicht ein bestimmter Mutations-Typ ist, sondern das Fehlen von beidem, einem intakten Fettsäuresynthetase-Komplexes wie auch seiner freien Untereinheiten. Etwa 50% der fas 1 und fas 2 Mutationen hatten demnach zur Folge, daß in ihnen weder das Produkt des mutierten fas-Gens noch dasjenige des nicht betroffenen fas-Gens vorliegt. Zur Erklärung des Zustandekommens eines solchen Phänotyps sind zwei Möglichkeiten vorstellbar: Einmal könnte es ein regulatorisches (i); zum anderen ein proteolytisches (ii) Phänomen sein:

(i) Wenn tatsächlich ein Kontrollmechanismus für den koordinierten Ausdruck der beiden fas-Gene besteht, so müßte es sich hierbei nach den erwähnten experimentellen Daten um eine wechselseitige, positive Kontrolle beider Genorte durch das Genprodukt des jeweils anderen fas-Gens handeln. Dies wäre ein relativ komplizierter und bisher bei anderen Systemen nicht beobachteter Mechanismus. Als Beweis für ihn müßten zusätzlich Regulationsmutanten isoliert werden können, in denen z.B. die eine Untereinheit weiterhin synthetisiert wird, obwohl die andere nicht gemacht werden kann. Solche Mutanten sind bisher jedoch noch nicht bekannt.

(ii) Eine andere Möglichkeit zur Erklärung des CRM-negativen Charakters von nicht-komplementierenden fas-Mutanten ist die Annahme, daß in ihnen die durch die Mutation veränderte Fettsäuresynthetase-Untereinheit die Fähigkeit verloren hat, mit der anderen genetisch intakten Untereinheit zu assoziieren. Die Folge davon könnte sein, daß die freien Untereinheiten durch Proteolyse rasch abgebaut werden. Es ist bekannt, daß die Geschwindigkeit proteolytischer Abbaureaktionen mit der Länge der jeweiligen Polypeptidketten zunimmt (65). Die beiden ungewöhnlich großen Fettsäuresynthetase-Untereinheiten

sollten demnach besonders empfindlich gegenüber dem Angriff proteolytischer Enzyme sein. Ein Schutz gegen diesen Abbau könnte sich im Verlauf der Evolution in Form der Assoziation zu einem multimeren Komplex mit Protease-resistenter Quartärstruktur herausgebildet haben (66). Es ist bekannt, daß manche Proteine nach Dissoziation in ihre Untereinheiten gegenüber dem Angriff von Proteasen empfindlicher werden (67). Dasselbe könnte bei bestimmten Fettsäuresynthetase-Mutanten erfolgen, bei denen eine Mutation entweder in fas 1 oder in fas 2 dazu führt, daß die Untereinheit B bzw. A nicht mehr mit der jeweils anderen Untereinheit aggregieren kann. Ein solches Verhalten wird natürlich besonders häufig bei Nonsense-Mutationen erwartet, aber es ist auch leicht für bestimmte Missens-Mutationen vorstellbar.

Durch dieses Modell ist auch leicht zu erklären, daß in der Zelle kein Überschuß an A oder B synthetisiert wird. Auch ohne besondere genetische Regulation wird dies nach der oben erwähnten Vorstellung dadurch erreicht, daß alle überschüssigen Fettsäuresynthetase-Untereinheiten durch Proteolyse sofort wieder abgebaut werden und die entsprechenden Aminosäuren somit der Zelle wieder für andere Reaktionen zur Verfügung stehen. Es wird ganz allgemein vermutet, daß in Eukaryonten viele Enzym Spiegel nicht so sehr durch Kontrolle der Proteinsynthese sondern durch die Abbau-Raten der betreffenden Proteine reguliert werden (68-71).

Die Existenz eines abnormalen, d.h. von der Wildtyp-ähnlichen Komplexstruktur abweichenden, kreuzreagierenden Fettsäuresynthetase-Materials in einigen wenigen nicht-komplementierenden fas-Mutanten wurde in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen. Eine befriedigende Erklärung über Struktur und Bildungsweise dieses Materials kann zur Zeit noch nicht gegeben werden. Fest steht nur, daß sein Molekulargewicht wesentlich kleiner ist als das des Wildtyp-Komplexes und daß es nicht alle antigenen Determinanten des Wildtyp-Proteins besitzt. Weiterhin konnte experimentell ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um einzelne Untereinheiten A bzw. B oder um niedri-

gere Assoziationsstufen des Komplexes handelt. In diesem Fall müßten beide Untereinheiten bei der SDS-Gelelektrophorese des Immunpräzipitats dieser Mutanten in gleicher Weise zu beobachten sein wie bei Wildtyp-Enzym. Dies ist jedoch nicht der Fall. Weiterhin kann aus dem bisher experimentell beobachteten SDS-Gelbandenmuster des Immunpräzipitats noch kein Schluß gezogen werden hinsichtlich der Proteinstruktur des kreuzreagierenden Materials in diesen Mutanten.

Überrascht hat der Befund, daß das immunologisch kreuzreagierende Material in allen diesen "abnormalen" Mutanten, auch unabhängig davon, ob es sich um fas 1 oder fas 2 Mutanten handelte, serologisch nicht unterscheidbar war. Während mit Wildtyp-Enzym in allen Fällen eine Spornbildung auftrat, wurde beim Vergleich der Mutanten untereinander ein "Verschmelzen" der Immunpräzipitationslinien beobachtet. Man könnte sich vorstellen, daß bei all diesen Mutanten der durch Mutation veränderte, ursprünglich in den Zellen synthetisierte Synthetase-Komplex durch Proteolyse partiell abgebaut wird, bis ein in allen Fällen identisches Protease-stabiles "Rumpf-Enzym" entstanden ist.

Nach neuesten, von anderen Laboratorien berichteten Ergebnissen sieht es so aus, daß die aus nur zwei, multifunktionalen Polypeptidketten bestehende Proteinstruktur des Fettsäuresynthetase-Komplexes nicht nur für den Enzymkomplex der Hefe charakteristisch ist, sondern daß die Fettsäuresynthetase anderer eukaryotischer Organismen eine ganz ähnliche Struktur aufweisen. So wurde gezeigt, daß die Fettsäuresynthetase aus Tauben-Leber (72), Hühner-Leber (73), Hasen-Leber (74) und Milchdrüsen von Ratten (75) ebenfalls nur aus zwei Proteinkomponenten besteht, von denen jede ebenfalls ein Molekulargewicht von 200 000 besitzt. Allerdings bilden die Untereinheiten in diesen Organismen offenbar keinen hexameren, sondern nur einen monomeren Komplex AB. Das von einigen Autoren berichtete Auftreten einer unabhängigen Acyl-Carrier-Proteinkomponente bei der Fettsäuresynthetase von Affen (76) ist mög-

licherweise eine gewisse Variante der Komplexstruktur in einigen Organismen. Jedoch zeigen diese Befunde, daß die Fettsäuresynthetase eukaryotischer Zellen sich generell von derjenigen in Prokaryonten dadurch unterscheidet, daß nur in Eukaryonten die Ausbildung multifunktionaler Polypeptidketten verwirklicht ist. Auch bei mehreren anderen eukaryotischen Multienzymkomplexen gibt es Hinweise dafür, daß auch hier die entsprechenden, in Prokaryonten separat vorliegenden, Teilenzyme zu multifunktionalen Proteinen verschmolzen sind (20,77,78). Man kann annehmen, daß diese Protein-Komplexe im Laufe der Evolution durch Genfusion entstanden sind. Der Vorteil eines solchen Systems besteht möglicherweise darin, daß die Assoziation eines Multienzymkomplexes aus wenigen, polyfunktionellen Proteinkomponenten kinetisch wesentlich günstiger abläuft, als dies bei der Aggregation vieler, monofunktionaler Einzelkomponenten der Fall wäre.

V. ZUSAMMENFASSUNG

- A. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Kontrolle des Ausdrucks der beiden Fettsäuresynthetase-Genloci fas 1 und fas 2 führten zu den folgenden Ergebnissen:
 1. Der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe kann durch Na-Dodecylsulfat dissoziiert werden, ohne dadurch die Fähigkeit zu verlieren, mit spezifischem Fettsäuresynthetase-Antiserum im Immundiffusionstest Präzipitationslinien zu bilden. Die einzelnen Untereinheiten sind demnach auch unabhängig von ihrem Einbau in den Komplex immunologisch nachweisbar. Aus der Tatsache, daß nicht-komplementierende fas-Mutanten gewöhnlich kein Fettsäuresynthetase-CRM enthalten wird daher geschlossen, daß im Zell-extrakt dieser Mutanten nicht nur kein inaktiver Komplex, sondern auch keine Komplex-Untereinheiten vorliegen.
 2. Die Abwesenheit des Fettsäuresynthetase-Komplexes wie auch seiner Untereinheiten im Cytoplasma nicht-komplementierender fas-Mutanten wurde außerdem auch durch Markierungsexperimente mit radioaktiven Aminosäuren nachgewiesen. Dabei wurden die Mutantenzellen nach der Markierungsphase in unmarkiertes Medium überführt und anschließend Bedingungen unterworfen, welche die Synthese des intakten Fettsäuresynthetase-Komplexes erlauben. In keinem Fall wurde hierbei der Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen in den Komplex beobachtet.
 3. Versuche, die Fettsäuresynthetase-Untereinheiten A und B - seien sie komplexgebunden oder frei - im Zellohex-trakt durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese direkt nachzuweisen, waren nicht erfolgreich. Es liegen im Zell-extrakt der Hefe offenbar noch andere Proteine mit demselben hohen Molekulargewicht vor, welche die Fettsäuresynthetase-Banden überdecken.

Für die geschilderten Ergebnisse liegen zwei Deutungsmöglichkeiten auf der Hand: Die beiden Genloci fas 1 und fas 2 könnten einmal einer koordinierten, und zwar positiven Kontrolle unterliegen derart, daß für den Ausdruck von fas 1 das Genprodukt von fas 2 benötigt wird, und umgekehrt. Oder aber es werden in der Zelle jegliche nicht-assoziierten, freien Komplex-Untereinheiten rasch proteolytisch abgebaut und entgehen damit den in dieser Arbeit angewandten Nachweis-Verfahren. CRM-negative nicht-komplementierende fas-Mutanten wären in diesem Fall alle diejenigen, bei denen durch die Mutation kein intakter Multienzymkomplex mehr synthetisiert wird, entweder weil eine der Untereinheiten nicht gemacht wird, oder weil sie die Fähigkeit zur Assoziation verloren hat.

B. Die Untersuchungen zur Struktur des Fettsäuresynthetase-Komplexes der Hefe führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe wurde durch präparative SDS-Gelelektrophorese in die beiden Untereinheiten A und B zerlegt. Durch Abbau mit einem Gemisch der Carboxypeptidasen A und B wurde Lysin als C-terminale Aminosäure der Untereinheit A und Valin als C-terminale Aminosäure der Untereinheit B ermittelt. Dieses Ergebnis ist eine wichtige Stütze der Hypothese, daß der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe nur aus zwei multifunktionellen Polypeptidketten besteht.
2. Durch analytische wie präparative isoelektrische Focussierung in Gegenwart von Harnstoff konnte der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe ebenfalls in nur zwei Banden aufgetrennt werden. Dabei läßt sich nur eine der beiden Fraktionen, und zwar die mit dem höheren isoelektrischen Punkt mit ^{14}C -Pantothenensäure markieren und entspricht somit der Untereinheit A bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Dieses Ergebnis ist ebenfalls eine Stütze der Zwei-Ketten-Theorie der Fettsäuresynthetase-Struktur. Es wäre sehr unwahrscheinlich, daß ein Gemisch aus vielen Untereinheiten sowohl bei der Trennung nach Ladung (Isoelektrische Focussierung) wie auch bei der nach Größe (SDS-Gelelektrophorese) stets nur zwei Fraktionen ergibt.
3. Die immunologische Untersuchung von intakter wie Harnstoff-dissoziierter Fettsäuresynthetase nach isoelektrischer Focussierung ergab, daß in beiden Fällen das Protein alle antigenen Determinanten des Wildtyp-Enzyms verloren hatte. Diese Methode eignet sich somit nicht für die Isolierung enzymatisch und immunologisch noch aktiver Untereinheiten des Fettsäuresynthetase-Komplexes.
4. Obwohl die meisten nicht-komplementierenden fas-Mutanten kein Fettsäuresynthetase-analoges kreuzreagierendes Material enthalten, wurde mit dem Rohextrakt von ca. 10% dieser Mutanten noch eine spezifische Immunpräzipitation beobachtet. Das betreffende CRM erwies sich allerdings nicht als Wildtyp-artiges Material, da es beim immunologischen Vergleich mit Wildtyp-Fettsäuresynthetase zur Ausbildung von Sporn-artigen Interferenzlinien kommt. Demnach enthält dieses Material nur noch einen Teil der antigenen Determinanten des Wildtyp-Enzyms. Im Gegensatz dazu sind die abnormalen CRM's dieser Mutanten untereinander immunologisch nicht zu unterscheiden. Es wird daraus geschlossen, daß in diesen Stämmen das mutierte Enzym proteolytisch labil ist und in allen Fällen bis zu einem bestimmten, jeweils identischen, "Rumpf"-Protein abgebaut wird.

5. Es wurde versucht, aus der Mutante fas 1-155 das unter 4. beschriebene abnormale CRM zu isolieren. Es stellte sich dabei heraus, daß dieses Material, das ein wesentlich geringeres Molekulargewicht als das Wildtyp-Enzym besitzt, mit den in dieser Arbeit benutzten Methoden nicht anreicherbar war, da es stets schon während der ersten Reinigungsschritte, wahrscheinlich durch Proteolyse, zerstört wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weitere Beweise dafür erbracht haben, daß der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe eine Struktur A_6B_6 aufweist, wobei A und B multifunktionelle Polypeptidketten sind. Es wurden allerdings keine Hinweise für die Existenz der freien Untereinheiten A bzw. B oder für die Existenz faßbarer Zwischenstufen ihrer Assoziation zum hexameren Komplex erhalten.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lynen F., Hopper-Kressel J. und Eggerer H.: Zur Biosynthese der Fettsäuren, III: Die Fettsäuresynthetase der Hefe und die Bildung enzymgebundener Acetessigsäure. Biochem. Z. 340, 95-124 (1964)
2. Lynen F.: Biosynthesis of saturated fatty acids. Fed. Proc. 20, 941-951 (1961)
3. Jesterhelt D., Sauer H. and Lynen F.: Crystallization of a multienzyme complex fatty acid synthetase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63, 1377-1382 (1969)
4. Schweizer E. and Bolling H.: A Saccharomyces cerevisiae mutant defective in saturated fatty acid biosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 660-666 (1970)
5. Majerus P.W., Albert A.W. and Wagelos P.R.: Acyl Carrier Protein from E. coli. Methods Enzymol. 14, 43-50 (1969)
6. Schweizer E., Kühn L. und Castorph H.: A New Gene Cluster in Yeast: The Fatty Acid Synthetase System. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 377-384 (1971)
7. Barkl G., Castorph H., Schweizer E.: Mapping of a Complex Gene Locus Coding for Part of the Saccharomyces cerevisiae Fatty Acid Synthetase Multienzyme Complex. Molec. Gen. Genetics 119, 315-322 (1972)
8. Kühn L., Castorph H., Schweizer E.: Gene linkage and gene-enzyme relations in the Fatty-Acid-Synthetase system of Saccharomyces cerevisiae. Europ. J. Biochem. 24, 492-497 (1972)
9. Henry S.A., Fogel S.: Saturated fatty acid mutants in yeast. Molec. Gen. Genetics 113, 1-19 (1971)
10. Schweizer E., Knier B., Castorph H., Holzner U.: Antithetin-Free Mutants of the Yeast-Fatty-Acid-Synthetase-Complex. Europ. J. Biochem. 39, 353-362 (1973)
11. Kühn L.: Genetische und biochemische Charakterisierung von Fettsäuresynthetase-Mutanten in Saccharomyces cerevisiae. Doktorarbeit Würzburg (1971)
12. Schlesinger M.J., Levinthal J.: Complementation at the molecular level of enzyme interaction. Ann. Rev. Microbiol. 19, 267-311 (1965)

13. Benzer S., Champe S.P.: A change from nonsense to sense in the genetic code.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 1114-1121 (1962)
14. Kühn L.: Genetische und biochemische Charakterisierung von Fettsäuresynthetase-Mutanten aus Saccharomyces cerevisiae. Dissertation, Würzburg (1972)
15. Meyer K.H., Schweizer E.: Control of Fatty-Acid Synthetase Levels by Exogeneous Long-Chain Fatty Acids in the Yeast Candida lipolytica and Saccharomyces cerevisiae.
Eur. J. Biochem. 65, 317-324 (1976)
16. Kresze G.-B., Oesterheld D., Lynen F., Castorph H., Schweizer E.: Localization of the central and peripheral SH-Groups on the same polypeptide chain of Yeast Fatty Acid Synthetase.
Biochem. Biophys. Res. Com., 69, 893-899 (1976)
17. Schwietz H.: Aminosäure-Endgruppenbestimmung im Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe. Diplomarbeit Würzburg (1975)
18. Narita K. "End Group Determination" in Mol. Biol. Biochem. and Biophys. 8, 25 (1970)
19. Narita K., Matsuo H., Nakajima T. in Protein Sequence Determination (ed. by S.B. Needleman).
Springer Verlag Berlin, pp 95-103 (1975)
20. Stoops J.K., Arslaman M.J., Oh Y.H., Aune K.C., Vanaman T.C. and Wakil S.J.: Presence of Two Polypeptide Chains Comprising Fatty Acid Synthetase.
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 1940-1944 (1975)
21. Mücke D.: Einführung in mikrobiologische Bestimmungsverfahren. VEB Georg Thieme Verlag, Leipzig (1957)
22. Lederberg J. and Lederberg E.M.: Replica plating and indirect selection of mutants.
J. Bacteriol. 63, 399-405 (1952)
23. Oesterheld D. Zur Kenntnis der Fettsäuresynthetase aus Hefe. Dissertation, München (1967)
24. Lynen F.: Yeast fatty acid synthetase.
Methods Enzymology 14, 17-33 (1963)
25. Gonnaris A., Hager L.P.: A Resolution of the E. coli Pyruvate Dehydrogenase Complex.
J. Biol. Chem. 236, 1013-1018 (1961)

26. Hsu R., Warson G., Porter J.W.: The Purification and Properties of the Fatty Acid Synthetase of Pigeon Liver. *J. Biol. Chem.* 240, 3736-3746 (1965)
27. Norris A., Matsumara S., Bloch K.: Fatty Acid Synthetase and β -Hydroxydecanol Coenzyme A Dehydrase from *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 239, 3653-3662 (1964)
28. Majerus P.W., Jacobs R., Smith M.B., Morris H.P.: The regulation of fatty acid biosynthesis in rat hepatomes. *J. Biol. Chem.* 242, 3588-3593 (1968)
29. Dutler H., Coon M., Kull A., Vogel H., Waldvogel G., Prelog V.: Fatty Acid Synthetase from Pig Liver. *Europ. J. Biochem.* 22, 213-217 (1971)
30. Beisenherz et al. Die Phosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyzerinaldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerinphosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang. *Z. Naturf.* 86, 555-561 (1953)
31. Hsu R., Lardy H.: Pigeon Liver Malic Enzyme. *J. Biol. Chem.* 242, 520-526 (1967)
32. Warburg O., Christian W.: Wasserstoffübertragende Fermente. *Biochem. Z.* 310, 384-421 (1941)
33. Lowry OH., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
34. Lynen F. Fatty Acid Synthesis from Malonyl-CoA, in "Methods in Enzymology" 5, 443-451 (1962)
35. Knobling A. Nachweis und biochemische Charakterisierung von Malonyl- und Palmityl-Transferase-defekten Mutanten des Fettsäuresynthetase-Komplexes der Hefe. Diplomarbeit Würzburg (1975)
36. Dannies P.S., Tashjian A.M.: Effects of Thyrotropin-releasing Hormone and Hydrocortison on Synthesis and Degradation of Prolactin. *J. Biol. Chem.* 248, 6174-6179 (1973)
37. Klier A., Lecadet M.M.: Evidence in Favour of the Modifikation in vivo of RNA Polymerase subunits during Sporogenesis in *B. thuringiensis*. *Eur. J. Biochem.* 47, 111-119 (1974)
38. Tjian R., Losick R.: An Immunological Assay for the Sigma Subunit of RNA Polymerase in Extrakts of Vegetative and Sporulating *B. subtilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2872-2876 (1974)

39. Greenleaf A.L., Linn T.G., Losick R.: Isolation of a New RNA Polymerase-Binding Protein from Sporulating B. subtilis.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 490-494 (1973)
40. Pringle J.: Methods for Avoiding Proteolytic Artefacts in Studies of Enzymes and other Proteins from Yeast. Methods in Cell Biologys Vol. XII, 149-168 (1975)
41. Maurer H.: Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamid Gel Electrophoresis.
W. de Gruyter, Berlin 1971
42. Weber K., Osborn M.: The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)
43. Chrambach A., Rodboard D.: Polyacrylamid-Gelelectrophoresis. Science 172, 440-451 (1971)
44. Diezel W., Kopenschläger G., Hofmann E.: An Improved Procedure for Protein Staining in Polyacrylamide Gels with a New Type of Coomassie Brilliant Blue.
Analyt. Biochem. 48, 617-620 (1972)
45. Ambler P.: Enzymatic Hydrolysis with Carboxypeptidases. Methods Enzymol. XXV, 143-157 (1972)
46. Folk J.E., Gladner J.A.: Carboxypeptidase B. J. Biol. Chem. 231, 379-391 (1958)
47. Vesterberg O.: Isoelectric Focusing of Proteins in Polyacrylamide Gels.
Biochem. Biophys. Acta 257, 11-19 (1972)
48. Finlayson G.R., Grambach A.: Isoelectric Focusing in Polyacrylamide-Gel and its Preparative Application. Analyt. Biochemie 40, 292 (1971)
49. Ostermann: Isoelectric Focusing.
Science Tools 17, 31-42 (1970)
50. Matzura H., Molin S., Maale O.: Sequential Biosynthesis of the β and β' Subunits of the DNA-dependent RNA-Polymerase from E. coli.
J. Molec. Biol. 52, 17-25 (1971)
51. Tauro P., Holzner U., Castorph H., Hill F., Schweizer E.: Genetic Analysis of Non-Complementing Fatty Acid Synthetase Mutants in Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genetics 129, 131-148 (1974)

52. Champell C.H., Garvey J.S., Cremer N.E., Sussdorf D.H.:
Methods in Immunology.
pp. 12 W.A. Benjamin, New York (1970)
53. Ouchterlony Ö.: Antigen-Antibody-Reactions in Gels.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 20, 507-512 (1949)
54. Ouchterlony Ö.: Handbook of Immundiffusion and
Immunelektrophoresis.
Ann. Arbor Science Publishers, Michigan USA (1968)
55. Dietlein G.: Untersuchung pleiotroper Fettsäuresynthetase-
Mutanten der Hefe mit Hilfe immunologischer Methoden.
Diplomarbeit Würzburg (1972)
56. Kniep B.: Isolierung von Pantothen-freien Mutanten des
Fettsäuresynthetase-Komplexes der Hefe.
Diplomarbeit Würzburg (1973)
57. Schweizer E., Willecke K., Winnewisser W., Lynen F.:
The Role of Phosphopantetheine in the Yeast Fatty Acid
Synthetase Complex.
Vitamins and Hormons Vol. 28, 329-343 (1970)
58. Grabar P. and Williams C.A., Jr.: Methode permettant
l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques d'un
mélange de protéines.
Biochem. Biophys. Acta 10, 193-194 (1953)
59. Williams C.A.: Immunelectrophoresis.
Scientific American 202, 130-139 (1960)
60. Grabar P.: Immunelectrophoretic Analysis.
Methods Biochem. Analysis 7, 1-39 (1959)
61. Sumper M., Riepertinger C., Lynen F.: Dissoziation and
Reconstitution of the stable Multienzymcomplex Fatty-
Acid-Synthetase from Yeast.
FEBS-Letters 5, 45-49 (1969)
62. Sumper M.: Der Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase aus
Hefe. Doktorarbeit München (1970)
63. Oesterhelt D., Bauer H., Lynen F.: Crystallisation of a
Multienzyme Complex: Fatty Acid Synthetase from Yeast.
Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 1377-1382 (1969)
64. Weithmann K.U.: Zur Kenntnis der Teilaktivitäten und der
Untereinheiten des Multienzymkomplexes Fettsäuresynthetase
aus Hefe. Doktorarbeit München (1974)
65. Dehlinger F.J., Schimke R.T.: Effect of Size on the rela-
tive Rate of Degradation of Rat Liver soluble Proteins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1473-1480 (1970)

66. Goldberg A.L., Dice J.F.: Intracellular Protein Degradation. Ann. Rev. Biochem. 43, 835-869 (1974)
67. Lin S., Zabin J.: β -Galactosidase: Rate of Synthesis and Degradation of incomplete chains. J. Biol. Chem. 247, 2205-2211 (1972)
68. Siekevitz P.: Protein Degradation in Plant Systems. J. Theor. Biol. 37, 321-334 (1972)
69. Schimke R.T.: Control of Enzyme Levels in Mammalian Tissues. Adv. Enzymol. 37, 135-187 (1973)
70. Rechcigl M.: in Enzyme Synthesis and Degradation in Mammalian Systems. pp.236-310 University Park Press, Baltimore (1971)
71. Goldberg A.L., Howell E.M., Li J.B., Martel S.B., Pronty W.F.: Physiological significance of protein degradation in animal and bacterial cells. Fed. Proc. 33, 1112-1120 (1974)
72. Lornitzo F.A., Qureski A.A., Porter J.W.: Separation of the Half-molecular Weight Nonidentical Subunits of Pigeon Liver Fatty Acid Synthetase. J. Biol. Chem. 249, 1654-1656 (1974)
73. Yun S.L., Hsu R.Y.: Fatty Acid Synthetase of Chicken Liver. J. Biol. Chem. 247, 2689-2698 (1972)
74. Demassieux S., Lachance J.P.: Palmitate Synthetase de Foie de Lapin. Biochem. Biophys. Acta 348, 94-114 (1974)
75. Smith S., Abraham S.: Fatty Acid Synthetase from Lactating Rat Mammary Gland. J. Biol. Chem. 245, 3209-3217 (1970)
76. Qureski A.A., Lornitzo F.A., Porter J.W.: The Isolation of Acyl Carrier Protein from the Pigeon Fatty Acid Synthetase Complex. Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 158-165 (1974)
77. Matchett W.H., De Moss J.A.: The Subunit Structure of Tryptophan Synthetase from *N. crassa*. J. Biol. Chem. 250, 2941-2946 (1975)
78. Calvo J.M., Fink G.R.: Regulation of Biosynthetic Pathways in Bacteria and Fungi. Ann. Rev. Biochem. 40, 943-968 (1971)

Benutzte Abkürzungen

a bzw.	Paarungstyp
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
CRM	Kreuzreagierendes Material
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
fas	Fettsäuresynthetase defizient
FMN	Flavinmononucleotid
g	Erdbeschleunigung
IpM	Impulse pro Minute
mA	Milliampere
MIN	Minimal-Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
TMED	N'N'N'N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan
ts-	Temperatur-sensitiv
μ	Mikro
UpM	Umdrehung pro Minute
WT	Wildtyp
YEP	Hefeextrakt-Pepton-Medium
YEP-FS	Hefeextrakt-Pepton-Fettsäure-Medium

LEBENS LAUF

Vor- und Familienname: Gerhard Dietlein
Geburtstag: 22. Juni 1946
Geburtsort: Neuebersbach, Kr. Neustadt/Aisch
Vater: Michael Dietlein, Oberstudiendirektor
Mutter: Alma Dietlein
Ehefrau: Irene Dietlein, geb. Kunert,
Fernmeldesekretärin

Schulbildung:

1952 - 1957 Volksschule in Schwabach
1957 - 1966 Gymnasium in Schwabach
Juli 1966 Abitur
1966 - 1968 Wehrdienst

Studium:

WS 1968 - WS 1973 Studium der Biologie in Würzburg
Oktober 1970 Diplom-Vorprüfung für Biologen
Okt. 1971 - Sept. 1972 Diplomarbeit im Institut für Biochemie
der Universität Würzburg unter Anleitung
von Prof. Dr. E. Schweizer
April 1973 Diplom-Hauptprüfung für Biologen
Fächer: Biochemie, Virologie, Pflanzen-
physiologie, Tierphysiologie
Mai 1973 - Aug. 1975 Doktorarbeit im Institut für Biochemie
der Universität Würzburg unter Anleitung
von Prof. Dr. E. Schweizer
Sept. 1975 - Sept. 1976 Fortsetzung der Doktorarbeit im Institut
für Biochemie der Universität
Erlangen

Angestelltenverhältnis:

Sept. 1973 - Nov. 1974 Stipendium nach dem Bayer. Gradienten-
förderungsgesetz
Dez. 1974 - Sept. 1976 Wiss. Assistent im Institut für
Biochemie der Universität Erlangen

ANHANG

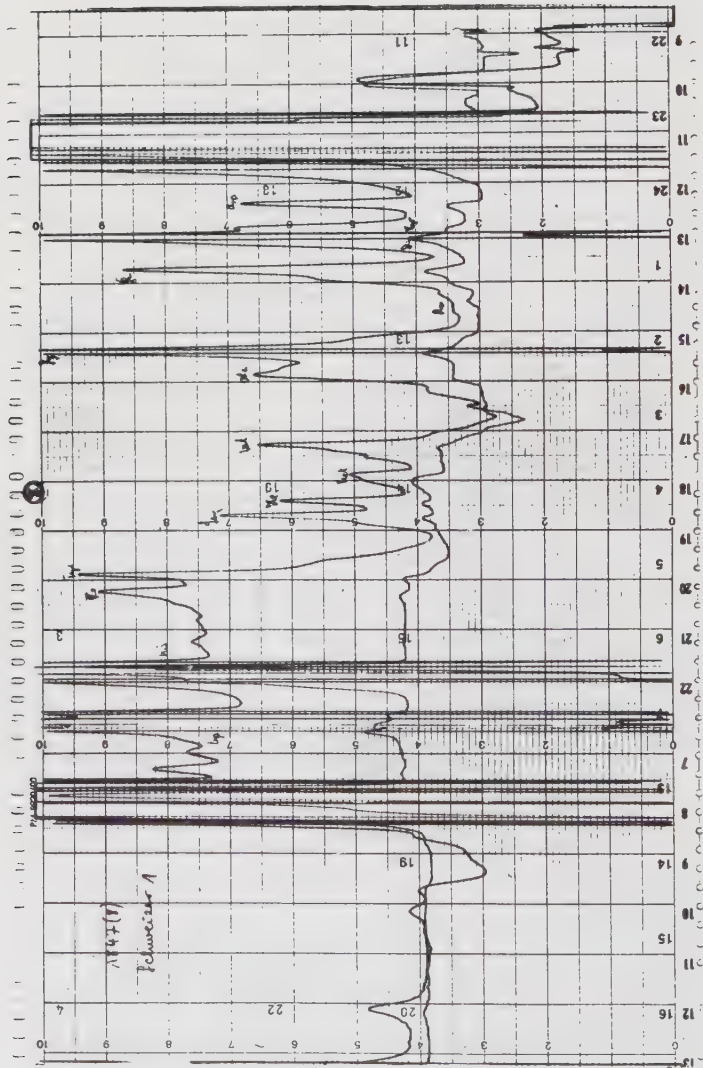


Fig. 28. Aminosäure-Chromatogramm eines Kontroll-Gels ohne Fettsäuresynthetase nach Behandlung mit Carboxypeptidasen

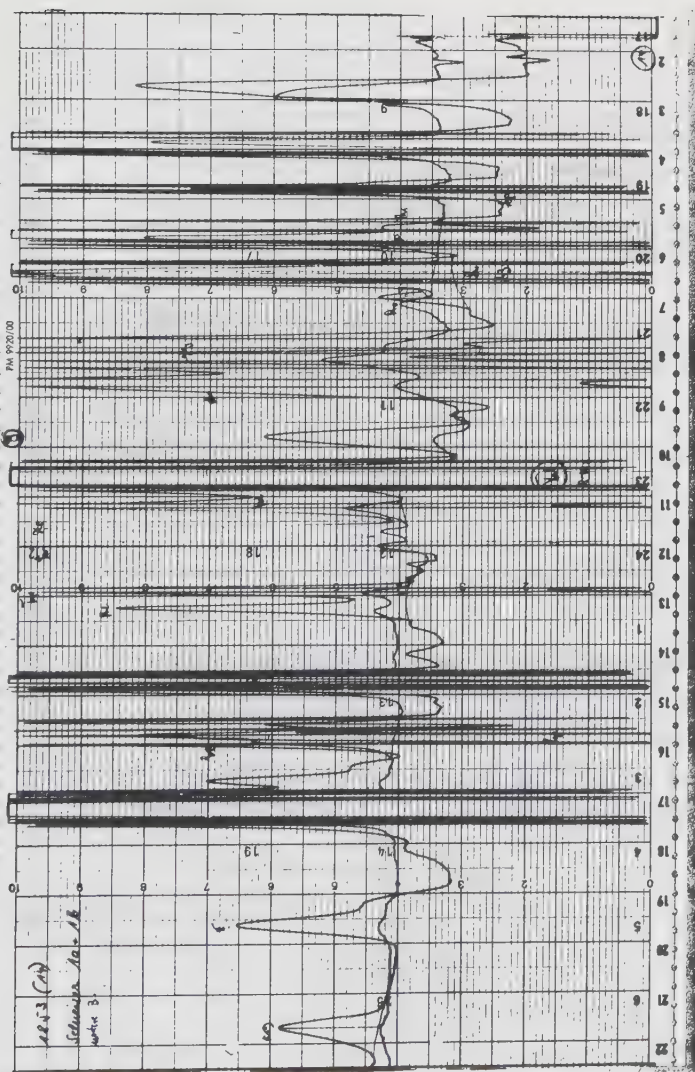


Fig. 29. Aminosäure-Chromatogramm des Carboxypeptidase-Hydrolysates der Fettsäuresynthetase-Untereinheit A

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990